

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Medicinální chemie



Kateřina Štverková

Chromatografická charakterizace iontově výměnné kolony

Chromatographic characterization of an ion exchange column

Bakalářská práce


Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. 05. 2019

Podpis 

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce, paní RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady při psaní této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a chápavý přístup během celé doby mého studia.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá charakterizací aniontově výměnné kolony pomocí modelu lineárních vztahů solvatační energie (LSER). Cílem bakalářské práce bylo nalézt experimentální podmínky vhodné pro separaci thiazidových diuretik (trichlormethiazid, bendroflumethiazid, butizid, chlorthalidon, mefrusid) na koloně PhenoSphere™ 5µm SAX 80 Å. Tyto experimentální podmínky byly následně použity pro změření retenčních faktorů LSER analytů, ze kterých byly vícenásobnou lineární regresí vypočítány LSER koeficienty popisující vzájemné interakce mezi stacionární fází, mobilní fází a analyty diuretik.

Klíčová slova: HPLC, iontově výměnná chromatografie, separace, diuretika, trichlormethiazid, bendroflumethiazid, butizid, chlorthalidon, mefrusid, charakterizace, LSER, Abrahamův model

Abstract

This bachelor thesis deals with the characterization of the anion exchange column by the linear solvation energy relationship (LSER) model. The aim of this bachelor thesis was to find optimal conditions suitable for separation of thiazide diuretics (trichlormethiazide, bendroflumethiazide, buthizide, chlorthalidone, mefrusid) on PhenoSphere™ 5µm SAX 80 Å column. These experimental conditions were used for measuring the retention factors of LSER analytes. The multiple linear regression was consequently applied to the retention factors to calculate the LSER regression coefficients, describing the interactions between the stationary phase, the mobile phase and the analytes.

Key words: HPLC, ion exchange chromatography, separation, diuretics, trichlormethiazide, bendroflumethiazide, buthizide, chlorthalidone, mefrusid, characterization, LSER, Abraham's model

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce.....	2
3	Přehled problematiky	3
3.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	3
3.2	Iontově výměnná chromatografie.....	4
3.2.1	Stacionární fáze	5
3.2.2	Mobilní fáze	6
3.3	Metoda LSER.....	7
3.3.1	Deskriptory v LSER rovnici.....	8
3.3.2	Regresní koeficienty v LSER rovnici.....	9
3.4	Funkce nefronu.....	10
3.5	Diuretika.....	11
3.5.1	Rozdělení diuretik	12
3.6	Separační metody využívané pro separaci vybraných diuretik	18
4	Experimentální část	20
4.1	Použité chemikálie	20
4.2	Použité přístroje a pomůcky	20
4.3	Postup přípravy.....	21
4.4	Podmínky měření diuretik	21
4.5	Podmínky měření LSER analytů.....	22
5	Výsledky a diskuze	23
5.1	Vliv pH mobilní fáze na retenci diuretik	23
5.2	Vliv množství methanolu v mobilní fázi na retenci diuretik	24
5.3	Vliv koncentrace fosforečnanového pufru v mobilní fázi na retenci	25
5.4	Vliv druhu organického modifikátoru v mobilní fázi na retenci diuretik.....	25
5.5	Separace analytů ze směsi	27
5.6	Analýza LSER modelových analytů	30
5.7	Vícenásobná lineární regrese.....	35
6	Závěr.....	37
7	Zdroje.....	39

Použité zkratky

<i>A</i>	Celková acidita vodíkové vazby (LSER)	Total hydrogen bond acidity (LSER)
ACN	Acetonitril	Acetonitrile
ADH	Antidiuretický hormon	Antidiuretic hormone
<i>B</i>	Celková bazicita vodíkové vazby (LSER)	Total hydrogen bond basicity (LSER)
<i>D</i> ⁻	Deskriptor disociovaného aniontu (LSER)	Dissociated anion descriptor (LSER)
<i>D</i> ⁺	Deskriptor disociovaného kationtu (LSER)	Dissociated cation descriptor (LSER)
<i>E</i>	Přebytečná molární refrakce (LSER)	Excess molar refraction (LSER)
ECT	Extracelulární tekutina	Extracellular fluid
GC	Plynová chromatografie	Gas chromatography
HEX	<i>n</i> -Hexan	<i>n</i> -Hexane
		Hydrophobic interaction
HIC	Hydrofobní interakční chromatografie	chromatography
		Hydrophilic interaction
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie	chromatography
HPLC		High performance liquid
	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	chromatography
IPA	Propan-2-ol	Propane-2-ol
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie	Liquid-liquid chromatography
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie	Liquid-solid chromatography
		The linear solvation energy
LSER	Model lineárních vztahů solvatační energie	relationship model
MeOH	Methanol	Methanol
MF	Mobilní fáze	Mobile phase
p.a.	Pro analýzu	Pro analysis
PC	Papírová chromatografie	Paper chromatography
<i>S</i>	Deskriptor polarizovatelnosti (LSER)	Polarizability descriptor (LSER)
SAX	Silný aniontový měnič	Strong anion-exchange
SDS	Dodecylsírán sodný	Sodium dodecyl sulfate
SF	Stacionární fáze	Stationary phase
TEA	Triethylamin	Triethylamine
TEAA	Octan triethylamonný	Trimethylamine acetate
THF	Tetrahydrofuran	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkovrstvá chromatografie	Thin-layer chromatography
<i>V</i>	McGowanův objem rozpuštěné látky (LSER)	McGowan dissolved volume (LSER)
WAX	Slabý aniontový měnič	Weak anion-exchange

1 Úvod

Chromatografie je analytická metoda využívající mnohonásobně opakované ustanovení rovnováhy mezi dvěma navzájem nemísitelnými fázemi – mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Poprvé byla použita v roce 1903 ruským biochemikem a botanikem M. S. Cvětem pro rozdělení rostlinných barviv (chlorofyl a karotenoidy) použitím skleněné kolony naplněné práškovým uhlíčitanem vápenatým. Odtud vychází i její pojmenování: *chromos* – barva a *graphein* – psaní. Z důvodu neznalosti vhodné aparatury byl rozvoj kapalinové chromatografie pomalý. Až po objevení rozdělovací chromatografie na počátku 40. let 20. století se kolonová kapalinová chromatografie začala rozvíjet do podoby, v jaké je známa dnes. Chromatografie je třetí nejpoužívanější technickou a našla využití v mnoha chemických, farmaceutických a biologických laboratořích, kde se využívá například pro separaci látek ze směsi, jejich identifikaci a také ke kvantitativní analýze.^{1,2}

Iontově výměnná chromatografie je typem kapalinové chromatografie určené pro separaci látek nesoucích náboj. Stacionární fází je měnič iontů, na kterém je navázaný anion nebo kation, mobilní fáze je tvořena vodným roztokem soli nebo jejich směsí a analytem je složka mající opačný náboj oproti stacionární fázi. Ionexová chromatografie je velmi používaná například v biochemii k analýze aminokyselin nebo k čištění peptidů a proteinů.^{1,3}

V této bakalářské práci je iontově výměnná chromatografie použita k nalezení vhodných podmínek pro separaci diuretik ze směsi. Tyto chromatografické podmínky jsou následně využity pro získání retenčních parametrů testovacích analytů pro model lineárních vztahů solvatační energie. S využitím této metody lze charakterizovat interakce probíhající na testované aniontově výměnné stacionární fázi při separaci vybraných diuretik.

2 Cíle práce

Cílem práce byla chromatografická charakterizace iontově výměnné kolony PhenoSphere SAX pomocí vybraných thiazidových diuretik a modelu lineárních vztahů solvatační energie (LSER).

Nejdříve budou nalezeny vhodné separační podmínky pro vybraná thiazidová diuretika, konkrétně trichlormethiazid, bendroflumethiazid, butizid, chlorthalidon a mefrusid. Optimalizace separačních podmínek pro tato léčiva bude sledovat vliv koncentrace a pH vodného pufru, vliv přídavku organického modifikátoru do mobilní fáze, případně jeho typ (methanol, acetonitril) na chromatografické chování vybraných diuretik.

Separační podmínky, vhodné pro analýzu thiazidových diuretik, budou následně využity pro metodu LSER. Za těchto podmínek bude proměřena retence sady testovacích analytů pro metodu LSER. Poté bude provedena vícenásobná lineární regrese mezi retenčními parametry testovacích analytů a jejich molekulárními deskriptory. Výsledný vztah mezi retencí a jednotlivými deskriptory nám poskytne informace o typu a intenzitě interakcí, které hrají důležitou roli při separaci vybraných thiazidových diuretik na zvolené aniontově výměnné stacionární fázi.

3 Přehled problematiky

3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografie je analytická metoda používaná nejen k separaci látek ze směsi, ale také k jejich kvantifikaci a identifikaci. Látky se separují na základě jejich rozdílu v síle interakcí mezi analytem a mobilní fází a analytem a stacionární fází, přičemž mobilní fáze (MF) a stacionární fáze (SF) spolu navzájem také interagují. SF a MF jsou fáze navzájem nemísitelné a existuje mezi nimi fázové rozhraní, ve kterém při separaci dochází k opakovanému ustavování rovnováhy dělených látek^{1,4}.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) je typem kapalinové chromatografie, kdy mobilní fáze je kapalina a stacionární fáze je buďto tuhá látka nebo film kapaliny ukotvený nebo chemicky navázaný na tuhou matici – nosič. Pomocí HPLC lze separované látky identifikovat a zároveň stanovovat jejich množství. Kvalitativní charakteristikou je retenční čas, t_R , což je doba, kterou analyt stráví v separační koloně. Kvantitativní charakteristikou je plocha pod píkem, A , nebo výška píku, h . Pokud se látka v koloně nezadržuje, její retenční čas udává tzv. mrtvý čas kolony, t_M . Pro míru retence je zaveden retenční faktor, k , který lze vyjádřit pomocí výše uvedených veličin takto^{1,5}:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Rozčlenění stacionárních fází v HPLC není v současné době snadné a lze je rozdělit podle různých parametrů⁶:

Podle skupenství stacionární fáze:

- Tuhá stacionární fáze – kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)
- Kapalná stacionární fáze – kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)

Podle uspořádání stacionární fáze:

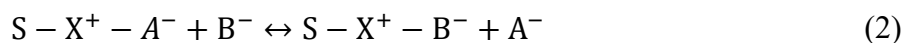
- Kolonová chromatografie
- Plošné techniky:
 - Papírová chromatografie (PC)
 - Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Podle povahy děje, který převládá při separaci:

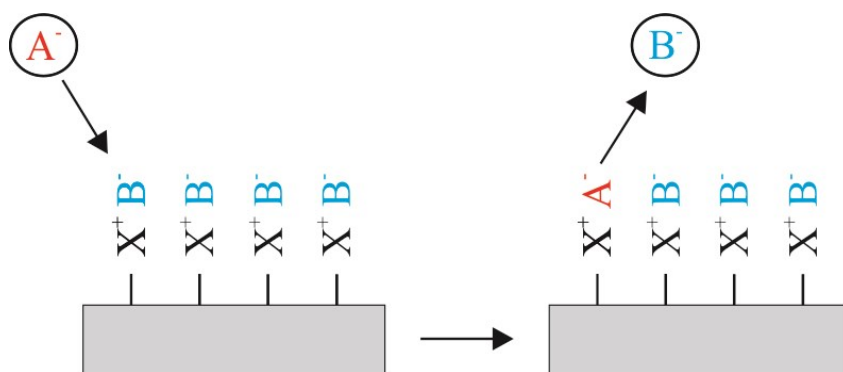
- Rozdělovací chromatografie
- Adsorpční chromatografie
- Iontově-výměnná chromatografie
- Gelová chromatografie
- Afinitní chromatografie

3.2 Iontově výměnná chromatografie

Na začátku roku 1940 byla iontově výměnná chromatografie navržena pro separaci diferenciálně nabitých nebo ionizovatelných molekul. Kvůli velké míře použitelnosti, nízkým nákladům a snadné automatizaci se tato metoda stala jednou z nejpoužívanějších LC metod. Princip je založen na interakci iontů přítomných v eluentu s iontovými funkčními skupinami fixovanými na chromatografickém nosiči. Interakce spočívá ve vytvoření iontové vazby mezi nabitou skupinou analytu a iontovou skupinou nosiče mající opačný náboj. Sílu interakce určuje počet a velikost náboje analytu a funkční skupiny SF. Ionty analytu a stejně nabité ionty eluentu si navzájem konkurují v navázání na opačně nabitou iontovou skupinu na povrchu SF. Pro anionty v analyzované směsi lze tuto situaci vyjádřit podle rovnice (2).^{1,3,7}



Na Obr. 1 je schematicky znázorněn princip separace. Aniont A^- analytu nahradí aniont eluentu B^- navázaný na kladně nabitý iont X^+ na povrchu SF. Adsorpce analytu na SF a desorpce iontů eluentu ze SF se během jejich cesty kolonou opakuje, což způsobuje separaci.^{3,8}



Obr. 1 Výměna iontů na povrchu iontoměniče

3.2.1 Stacionární fáze

SF je sestavená ze dvou konstrukčních prvků, a to z nabitých skupin, které se podílejí na výměnném procesu, a z matrice, na které jsou tyto nabité skupiny fixovány. Tyto skupiny mohou obsahovat³:

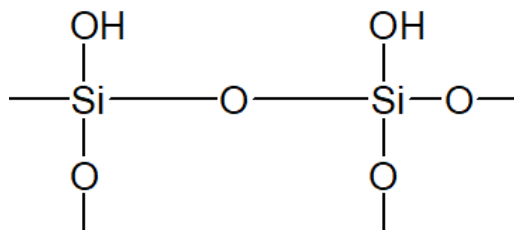
- protony (H^+),
- hydroxidové skupiny (OH^-),
- monoatomické ionty s nábojovým číslem jedna (K^+ , Na^+),
- monoatomické ionty s nábojovým číslem dva (Ca^{2+} , Mg^{2+}),
- polyatomické anorganické ionty ($-SO_3^-$, $-PO_3-H^-$)
- organické báze (NR_2H^+) a kyseliny ($RCOO^-$).

Tyto nabité skupiny lze rozdělit na kationtové iontoměniče (katexy) a aniontové iontoměniče (anexy). Anexy jsou nerozpustné polymerní polyvalentní báze, které uvolňují a vyměňují anionty. Lze je rozdělit na slabé (WAX) a silné (SAX) iontoměniče. Příklady funkčních skupin, které tvoří WAX a SAX jsou uvedeny v Tab. 1.¹

Tab. 1 Příklady funkčních skupin používané v iontově-výměnné chromatografii

<i>Funkční skupina</i>	<i>Vzorec</i>	<i>Typ ionexu</i>
<i>Tetramethylamoniový kation</i>	$-(CH_3)_4N^+$	SAX
<i>Kvartérní amin</i>	$-N(CH_3)_2(C_2H_5OH)^+$	SAX
<i>Diethylamin</i>	$-N^+H(CH_2CH_3)_2$	WAX
<i>Diethylaminoethyl</i>	$-(CH_2)_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$	WAX
<i>Dimethylaminoethanol</i>	$-O-(CH_2)_2-N^+H(CH_3)_2$	WAX
<i>Polyethylenimin</i>	$-(NH-CH_2-CH_2-)_n-NH_3^+$	WAX

Jako matrice se nejčastěji využívá polární anorganický sorbent silikagel. Z důvodu vysoké mechanické odolnosti vůči vysokým tlakům (důležité pro HPLC) a nesrážlivosti v přítomnosti organických rozpouštědel je ideálním nosičem. Jako aktivní centra jsou využity hydroxylové (silanolové) skupiny umístěné na povrchu silikagelu (viz Obr. 2). Díky těmto skupinám je povrch silikagelu slabě kyselý a při použití pufované mobilní fáze dochází k výměně protonů silanolových skupin za kationty pufru. Silikagel se používá jako nosič stacionární fáze, ale lze ho v nemodifikovaném stavu použít jako kationtově výměnný materiál. Limitujícím parametrem pro použití silikagelu jako matrice je jeho rozpustnost při pH vyšším než hodnota osm a při pH 2 a nižším může dojít k odtrhávání chemicky vázané SF.^{1,3}



Obr. 2 Silanolové skupiny silikagelu

3.2.2 Mobilní fáze

Obecně se používají eluenty složené z vodného roztoku vhodné soli nebo směsi solí, popřípadě s malým procentem organického rozpouštědla. Koncentrace a druh iontů, pH a iontová síla eluentu jsou nejdůležitější vlastnosti MF ovlivňující její eluční charakteristiky. Dělené ionty analytů jsou z kolony eluovány zvyšující se koncentrací iontů v mobilní fázi v pořadí, v jakém stoupá afinita iontů ke stacionární fázi. Tuto afinitu vyjadřuje koeficient selektivity K_M^A , což je v podstatě rovnovážná konstanta iontové výměny daná rovnicí (4), která popisuje iontovou výměnu probíhající podle rovnice (3):



$$K_M^A = \frac{[M^-]_M [A^-]_S}{[M^-]_S [A^-]_M} , \quad (4)$$

kde indexy S a M značí stacionární a mobilní fázi a $[M^-]$ a $[A^-]$ značí koncentrace aniontů mobilní fáze a aniontů analytu. Vyjádřením retenčního faktoru dostaneme vztah daný rovnicí (5)

$$k = \frac{n_S}{n_M} = \frac{V_S}{V_M} \frac{[A^-]_S}{[A^-]_M} , \quad (5)$$

kde n_S a n_M jsou počty molů analytu ve SF a MF a V_S a V_M jsou objemy SF a MF. Pro použitelnost rovnice v praxi se používá vztah (6), který je kombinací vztahů (4) a (5)

$$k = \frac{V_S}{V_M} K_M^A \frac{[K^+]_S}{[M^-]_M} , \quad (6)$$

kde $[K^+]$ je koncentrace iontově výměnných funkčních skupin – kationtů ve SF. Tato koncentrace je nazývána iontově výměnná kapacita měniče. Z tohoto vztahu vyplývá, že s rostoucí koncentrací aniontů v mobilní fázi retenční faktor klesá.^{1,8}

Iontově-výměnná chromatografie je účinná pouze v určitém rozsahu hodnot pH. Velmi zásadité nebo kyselé roztoky regenerují kationtový nebo aniontový měnič na jejich H^+ nebo OH^- formu a jakákoliv sorpce jiných iontů je za těchto podmínek omezená nebo zcela nemožná. Iontová síla mobilní fáze silně ovlivňuje dostupnou kapacitu měniče. Vysoká iontová síla snižuje sorpci sorbovaných iontů, a to i při extrémních hodnotách pH, proto musí mít na začátku měření dostatečně nízkou hodnotu.⁹

Pro udržení určitého rozsahu pH se jako mobilní fáze používají pufrы a při jeho volbě hrají roli důležité faktory, kterými jsou stupeň disociace/protonizace iontoměničové funkční skupiny a analytu a iontová síla.³

3.3 Metoda LSER

Model lineárních vztahů solvatační energie LSER (*Linear solvation energy relationships*) vychází z předpokladu, že retenci analytu lze vyjádřit jako součet příspěvků pocházejících z několika nezávislých typů interakcí. Nejčastěji se LSER model vyjadřuje rovnicí (7) (někdy též označovanou jako Abrahamova rovnice)

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV, \quad (7)$$

kde k je retenční faktor analytu, c je systémová konstanta; E , S , A , B a V jsou molekulové deskriptory analytu a e , s , a , b a v jsou regresní koeficienty související s vlastnostmi stacionární fáze a mobilní fáze, popisují konkrétní chromatografický systém za daných použitých podmínek. Tato metoda byla původně navržena pro popis retence pouze neutrálních molekul. Později byla rovnice rozšířena o další dva deskriptory popisující interakce spojené s retencí ionizovatelných molekul. Takto upravená rovnice nabývá tvaru, který vyjadřuje rovnice (8).^{10,11}

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV + d^-D^- + d^+D^+. \quad (8)$$

Model LSER je užitečný při testování nových SF a lze také ho využít k výzkumu retenčního chování léčiv a jiných biologicky významných látek.¹²

3.3.1 Deskriptory v LSER rovnici

Význam jednotlivých molekulárních deskriptorů, které jsou využívány k popisu retence analytu je následující^{11,12}:

- **Deskriptor E – přebytečná molární refrakce** – popisuje schopnost polarizace molekuly v porovnání se stejně velkým nepolárním alkanem a je odvozen z indexu lomu dané sloučeniny.
- **Deskriptor S – dipolarita / polarizovatelnost** – popisuje polární vlastnosti analytu, ochotu tvořit permanentní dipól a významně se uplatňuje v GC při použití polární SF.
- **Deskriptor A – celková acidita vodíkové vazby** – popisuje schopnost rozpuštěné látky poskytnout atom vodíku k vytvoření vodíkové vazby s molekulami mobilní a stacionární fáze.
- **Deskriptor B – celková bazicita vodíkové vazby** – popisuje schopnost rozpuštěné látky přijmout atom vodíku k vytvoření vodíkové vazby s molekulami mobilní a stacionární fáze.
- **Deskriptor V – McGowanův objem rozpuštěné látky** – souvisí s vytvořením dutiny pro rozpuštěnou látku ve SF, přechodem látky z MF do SF a uzavření dutiny. Tento deskriptor se vypočítá na základě struktury daného analytu za použití tabulkových hodnot molárních objemů jednotlivých částí a délky vazeb mezi nimi.
- **Deskriptor D^- – záporný náboj** – popisuje stupeň disociace analytu v použité mobilní fázi, tedy vyjadřuje velikost záporného náboje, který nesou anionty nebo zwitterionty.
- **Deskriptor D^+ – kladný náboj** – popisuje stupeň protonace analytu v použité mobilní fázi, tedy vyjadřuje velikost kladného náboje, který nesou kationty nebo zwitterionty.

Podle rovnic(9) a (10) lze vypočítat stupeň disociace a protonace rozpuštěné látky

$$D^- = \frac{10^{(\text{pH}^* - \text{pK}^*)}}{1 + 10^{(\text{pH}^* - \text{pK}^*)}}, \quad (9)$$

$$D^+ = \frac{10^{(\text{pK}^* - \text{pH}^*)}}{1 + 10^{(\text{pK}^* - \text{pH}^*)}}, \quad (10)$$

kde pK^* je disociační konstanta kyseliny nebo báze v hydroorganické mobilní fázi (používá se často hodnota ve vodném prostředí) a pH^* popisuje účinné ^spH , které se získá po smíchání vodného pufru s organickým rozpouštědlem a liší se od hodnoty vodného ^wpH

pufru před smícháním s organickým rozpouštědlem. pH^* hydroorganické mobilní fáze je měřeno elektrodou kalibrovanou pomocí vodných pufrů.^{10,11}

3.3.2 Regresní koeficienty v LSER rovnici

Tyto koeficienty lze získat lineární regresi experimentálně naměřených retenčních faktorů pro danou sadu testovacích analytů na konkrétní stacionární fázi. Pozitivní hodnota koeficientu znamená, že specifická interakce mezi rozpuštěnou látkou a SF je silnější než interakce mezi rozpuštěnou látkou a MF. Pokud je hodnota koeficientu záporná, silnější interakce je mezi rozpuštěnou látkou a MF. Pokud je regresní koeficient nulový, znamená to, že velikost interakce analytu mezi SF a MF je totožná, nebo že daná interakce k retenci analytu nepřispívá. Systémová konstanta, c , je za daných podmínek pro daný systém charakteristická a konstantní.^{10,11,12}

- **Regresní koeficient e** – popisuje možné interakce rozpuštěné látky pomocí n - a π -elektronového systému.
- **Regresní koeficient s** – popisuje interakce typu dipol-dipol a dipol-indukovaný dipol.
- **Regresní koeficient a** – popisuje schopnost tvorby vodíkové vazby mezi SF, MF a analytem, analyt je donor vodíku.
- **Regresní koeficient b** – popisuje schopnost tvorby vodíkové vazby mezi SF, MF a analytem, MF a SF jsou donory vodíku, analyt je jeho akceptorem.
- **Regresní koeficient d^+ a d^-** – popisuje příspěvek SF a MF k iontovým interakcím.
- **Regresní koeficient v** – charakterizuje disperzní interakce analytu v chromatografickém systému.

3.4 Funkce nefronu

Ledviny jsou párový orgán. Jejich úkolem je vylučování nežádoucích, odpadních a toxických látek, udržování stability vnitřního prostředí organismu a regulace složení a objemu krve. Základní anatomickou jednotkou je nefron. Nefron je složen z glomerulu, proximálního tubulu, Henleovy kličky, distálního kanálku a sběrného kanálku.^{13,14}

Glomerulus je umístěn v Bowmanově váčku a dochází v něm k filtraci krevní plazmy přes glomerulární bazální membránu za vniku primární moči. Primární moč má stejné složení jako krevní plazma s výjimkou bílkovin, které přes póry neprojdou kvůli negativním nábojům glykoproteinů v membráně, takže onkotický tlak v Bowmanově váčku je téměř nulový.^{13,14}

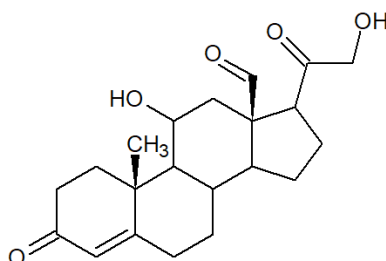
V proximálním tubulu dochází k resorpci většiny nízkomolekulárních látek např. H_2O , Na^+ , K^+ Cl^- , aminokyselin a glukosy. Reabsorpce Na^+ probíhá z větší části přes luminální membránu pomocí kotransportérů s organickými látkami. Menší část sodných kationtů je do buňky reabsorbována výměnou za vodíkový iont. Díky přítomnosti sodno-draselné pumpy v bazolaterální membráně vzniká v buňce koncentrační gradient, který využívají jak kotransportéry, tak Na^+/H^+ výměník.^{13,14}

Henleova klička vytváří protiproudý koncentrační mechanismus. Skládá se ze sestupného (descendentní) raménka, ve kterém se resorbuje H_2O z moči do intersticia, čímž dojde k zakoncentrování moči, a vzestupného (ascendentní) raménka, jehož membrána není propustná pro vodu. Velká část Na^+ zde vstupuje do buněk na luminální straně pomocí $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransportéru, pro jehož správnou funkci je nutné, aby v lumenu bylo přítomno vždy dostatečné množství K^+ , což zajišťuje draselný kanál v luminální membráně.^{13,14}

Do distálního kanálku přitéká hypotonická tekutina z Henleovy kličky. Je to místo, ve kterém dochází k regulaci resorpce Na^+ z moči do krve a absorpce K^+ do moči. Tento děj je podporován hormonem aldosteronem (viz Obr. 3). Tento hormon v distálním tubulu a epitelu sběrných kanálků zvyšuje syntézu důležitých proteinů pro tvorbu sodno-draselného kanálu na luminální straně a Na^+/K^+ -ATPázy na bazolaterální straně buňky. Jeho účinkem dojde k zabránění ztrátě Na^+ , čímž se zároveň zabrání vyloučení vody. V distálním kanálku dochází také k sekreci H^+ .^{13,14}

Ve sběrném kanálku vzniká definitní moč. Vstřebání další vody a zakoncentrování moči je řízeno pomocí vazopresínu (ADH).^{13,14}

Hlavním iontem extracelulární tekutiny (ECT) je sodný kationt, který na sebe váže ze všech iontů nejvíce vody. Jeho koncentrace v ECT je mnohem vyšší než v intracelulární tekutině a v případě jeho retence dochází i k retenci vody. Účinek většiny diuretik spočívá v ovlivňování této funkce sodných kationtů.¹⁵



Obr. 3 Strukturní vzorec aldosteronu

3.5 Diuretika

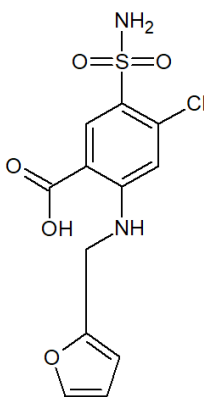
Diuretika jsou látky vyvolávající vylučování moče ovlivňováním a regulací transportních mechanismů a iontových kanálů v různých úsecích nefronu. Používají se v případech, kdy je zapotřebí vyloučit z organismu větší množství extracelulárních tekutin např. léčba otoků. Také se používají jako antihypertenziva, jelikož při vyloučení většího množství vody dochází k poklesu objemu cirkulující krve, což způsobí pokles krevního tlaku. Při chronickém srdečním selhání dochází k retenci sodíku a vody, které se projeví hromaděním na plicích nebo vznikem otoků, proto se u tohoto onemocnění využívají diuretika. Pro léčbu mírného stupně srdečního selhání lze pacientovi podat diuretika thiazidová. V případě progresu selhávání se použijí kličková diuretika a pro pokročilejší fáze onemocnění se kombinují thiazidová a kličková diuretika působící na různých místech nefronu. Podobný účinek mají diuretika i při cirhóze jater. V žilách před játry se hromadí krev, která se filtruje do dutiny břišní, což způsobí nahromadění vody v břiše.^{16,17,18}

3.5.1 Rozdělení diuretik

Diuretika se rozdělují do skupin podle místa účinku, chemické struktury a dalších specifických vlastností.

3.5.1.1 Diuretika Henleovy kličky

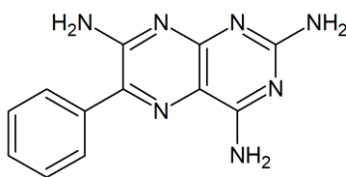
Tato diuretika blokují transport Na^+ v ascendentním raménku Henleovy kličky, což zvýší diurézu. V distálním tubulu a sběrném kanálku však dochází ke zvýšené sekreci K^+ a H^+ , což může způsobit závažnou hypokalémii. Do této skupiny patří furosemid (viz Obr. 4), který je nejčastějším používaným zástupcem této skupiny. Mezi další zástupce patří kyselina etakrynová, muzolimin a etozilin.¹⁹



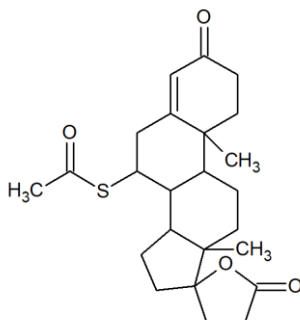
Obr. 4 Strukturní vzorec furodemidu

3.5.1.2 Kalium šetřící diuretika

Diuretika, patřící do této skupiny, působí z lumenální strany distálního kanálku a v kortikálních úsecích sběrných kanálku, kde brání reabsorpci sodíku výměnou za draselné a vodíkové ionty. Jejich diuretický účinek je však slabý, jelikož se zde sodík vstřebává pouze ze 2 %. Mezi diuretika, využívající tento mechanismus, patří amilorid nebo triamteren (viz Obr. 5). Jejich účinek je však nezávislý na aldosteronu. Dalšími zástupci této skupiny jsou spironolakton (viz Obr. 6) nebo eplerenon. Tyto látky jsou oproti předchozím antagonisté aldosteronu. Váží se na receptor pro aldosteron a ruší stimulaci syntézy proteinů, které vytváří sodný kanálek a iontovou pumpu, což způsobí zvýšené vylučování Na^+ a snížené vylučování K^+ a H^+ .^{19,20,21}



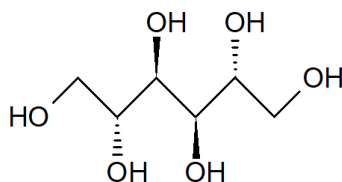
Obr. 5 Strukturní vzorec triamterenu



Obr. 6 Strukturní vzorec spironolaktonu

3.5.1.3 Osmotická diuretika

Funkcí těchto diuretik je zvyšování exkrece vody. Sestupným raménkem Henleovy kličky a proximálním tubulem může prostupovat voda. Přítomnost osmoticky aktivní látky, která nepodléhá reabsorpci, způsobuje v těchto částech zadržování vody a tím přispívá k jejímu vylučování. Jako první osmotické diuretikum byla používaná močovina. Pokud ale byla poškozena funkce ledvin, došlo k výraznému zvýšení dusíku v těle. V současné době se močovina jako diuretikum nevyužívá. Nyní je takto využívaným léčivem mannitol (viz Obr. 7) v 10-20% vodném roztoku, který je vylučován glomerulární filtrací a nepodléhá tubulární sekreci nebo reabsorpci.^{20,22}



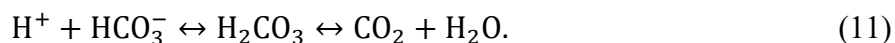
Obr. 7 Strukturní vzorec mannitolu

3.5.1.4 Antagonisté antidiuretického hormonu (aquaretika)

Tato diuretika způsobují blokaci receptoru ADH arginin-vazopresinu. Tolvaptan je selektivní inhibitor receptorů V_2 pro vazopresin lokalizovaných ve sběrných kanálcích ledvin. Tato látka zvyšuje diurézu, snižuje osmolalitu moče a neovlivňuje vylučování sodíku do moče. Mezi další zástupce patří například conivaptan.^{19,23}

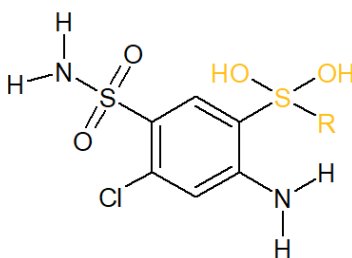
3.5.1.5 Inhibitory karboanhydrázy

Sekrece H^+ iontu do tubulární tekutiny (primární moči) probíhá pomocí Na^+/H^+ antiportu, který se nachází v luminální membráně buněk proximálního tubulu. V tubulární tekutině dochází působením karbonátdehydrogenasa lokalizované na luminální straně membrány k přeměně H^+ a HCO_3^- na CO_2 a H_2O podle rovnice (11). Tyto molekuly snadno prostoupí membránou do epitelových buněk tubulu, kde vytvoří H^+ a HCO_3^- za opětovné katalýzy karboanhydrázy.

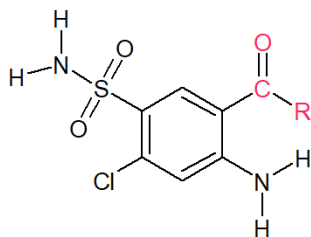


HCO_3^- přechází pomocí $Na^+/3HCO_3^-$ kotransportéru nebo přenosem pomocí aniontové výměny Cl^-/HCO_3^- do intersticiální tekutiny. H^+ ionty se pomocí Na^+/H^+ antiportu vrací zpět do tubulární tekutiny. Pokud by byl enzym karboanhydráza inhibován, probíhaly by tyto reakce pomalu a z rychle proudící primární moči by se zpátky resorbovalo méně Na^+ , HCO_3^- a vody.^{15,24}

Tento mechanismus využívají diuretika acetazolamid nebo dorzolamid, avšak nadměrná ztráta HCO_3^- způsobuje metabolickou acidózu, proto bylo od těchto léčiv upuštěno a byly nahrazeny látkami s *o*-chlorbenzensulfonamidovým seskupením. Struktura těchto diuretik má v poloze *meta* vůči sulfoamidové skupině skupinu sulfonylovou nebo karbonylovou a v poloze *para* aminoskupinu, která může být substituována. Schématické struktury tohoto typu diuretik jsou zobrazeny na Obr. 8 a Obr. 9.¹⁶



Obr. 8 Sulfonylový typ sulfonamidových diuretik



Obr. 9 Karbonylový typ sulfonamidových diuretik

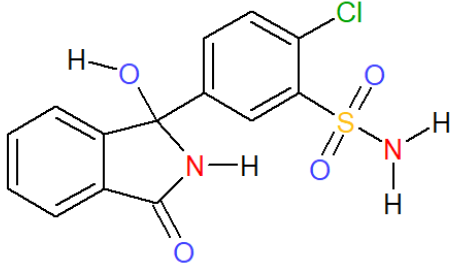
3.5.1.6 Thiazidová diuretika

Předchůdcem thiazidových diuretik je skupina inhibitorů karboanhydrázy. Oproti předchozí skupině mají tyto sloučeniny v sousedství sulfonamidové skupiny atom chloru nebo skupinu $-\text{CF}_3$. Tyto látky inhibují transportní iontové mechanismy na lumenální membráně distálního tubulu. Zabraňují reabsorpci chloridu tím, že inhibují kotransportér Na^+/Cl^- , což způsobuje zvýšení diurézy. Mezi tato diuretika patří trichlormethiazid, bendroflumethiazid a butizid. Analogem těchto diuretik je chlorthalidon.^{21,24}

Chlorthalidon

Chlorthalidon je benzensulfonamid-ftalimidin, tautomerizující se na formu benzofenu. Tato látka oproti ostatním nemá strukturu benzothiadiazinu. Používá se k léčbě edému, hypertenze a městnavého srdečního selhání. Ve srovnání s ostatními thiazidy má neobvykle dlouhé trvání účinku. Odstraněním aminosulfonylové skupiny z molekuly chlorthalidonu dochází ke snížení diuretického účinku a zvyšování jeho antihypertenzní aktivity. Analoga chlorthalidonu s otevřeným řetězcem (deriváty sulfamoyl-benzoyl-benzoové kyseliny) mají slabší diuretickou aktivitu a kratší dobu účinku.²⁵ Základní fyzikálně-chemické vlastnosti chlorthalidonu, relevantní pro tuto práci, jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2 Základní fyzikálně-chemické vlastnosti chlorthalidonu²⁶

Strukturní vzorec:			
Systematický název:	<i>2-chlor-5-(2,3-dihydro-1-hydroxy-3-oxo-1H-isoindol-1-yl)benzensulfonamid</i>		
M_r	pKa (nejkyslejší)	Vzhled	Rozpustnost ve vodě při 20 °C /mg·l⁻¹
338,8	8,76	Bílý prášek	120

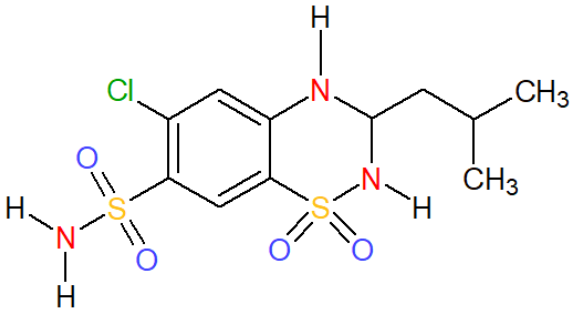
Butizid, trichlormethiazid a bendroflumethiazid

Butizid (viz Tab. 3), trichlormethiazid (viz Tab. 4) a bendroflumethiazid (viz Tab. 5) jsou deriváty benziothiadiazinu. Jsou považovány za zvláštní typy diuretik i přes existenci *o*-chlorbenszensulfonamidové strukturní jednotky ve své molekule. Bývají součástí léčiv, které se využívají k léčení kardiálních, renálních a těhotenských edémů a hypertenzí.¹⁶

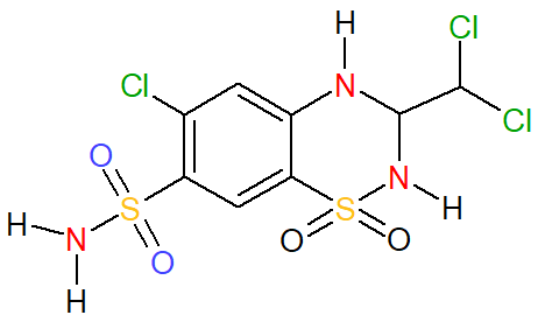
Bendroflumethiazid podporuje vylučování sodíku, chloridu a vody z krve do distálního tubulu. Zprvu může způsobit snížení objemu extracelulární tekutiny a plazmy a snížení srdečního výkonu. Po několika týdnech se oba objemy a srdeční výkon vrátí k normálu.²⁷

Trichlormethiazid se používá také pro léčbu hyperkalciurie díky jeho schopnosti odstraňovat vápník z moči a vracet jej zpět do krevního oběhu.²⁸

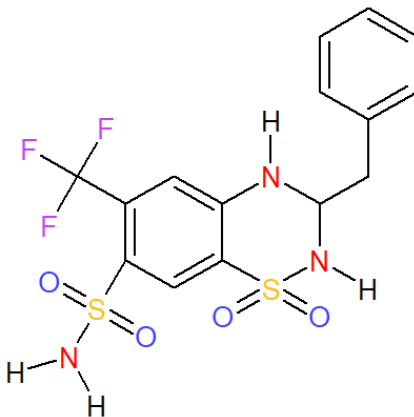
Tab. 3 Základní fyzikálně-chemické vlastnosti butizidu²⁹

Strukturní vzorec:			
Systematický název:	<i>6-Chloro-3,4-dihydro-3-isobutyl-2H-1,2,4-benzothiadiazin-7-sulfonamid 1,1-dioxid</i>		
M_r	pK_a (nejkyselejší)	Vzhled	Rozpustnost ve vodě při 25 °C /mg·l⁻¹
353,8	9,07	Bílý prášek	49,7

Tab. 4 Základní fyzikálně-chemické vlastnosti trichlormethiazidu³⁰

Strukturní vzorec:			
Systematický název:	<i>6-chloro-3-(dichloromethyl)-1,1-dioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazin-7-sulfonamid</i>		
M_r	pK_a (nejkyselejší)	Vzhled	Rozpustnost ve vodě při 25 °C /mg·l⁻¹
380,6	8,32	Bílý krystalkový prášek	800

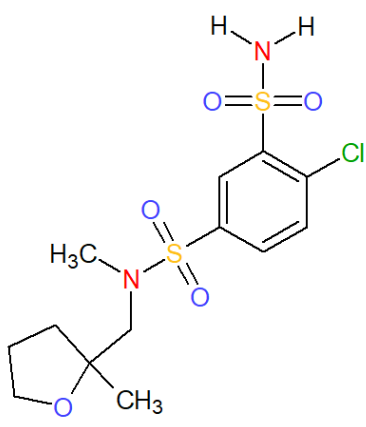
Tab. 5 Základní fyzikálně-chemické vlastnosti bendroflumethiazidu³¹

Strukturní vzorec:			
Systematický název:	<i>3-benzyl-1,1-dioxo-6-(trifluormethyl)-3,4-dihydro-2H-1,6,6,7,8-benzothiadiazin</i>		
M_r	pK_a (nejkyselejší)	Vzhled	Rozpustnost ve vodě při 25 °C /mg·l⁻¹
424,4	9,04	Bílo-krémový prášek	108

Mefrusid

Mefrusid (Tab. 6) je benzensulfonamid-furan. Patří mezi thiazidová diuretika a prodává se pod názvem Baycaron. Užívá se k léčbě hypertenze buďto samostatně nebo v kombinaci s jiným přípravkem snižujícím krevní tlak.³²

Tab. 6 Základní fyzikálně-chemické vlastnosti mefrusidu³²

Strukturní vzorec:			
Systematický název:	<i>4-chlor-1-N-methyl-1-N-[(2-methyloxolan-2-yl)methyl]benzen e-1,3-disulfonamide</i>		
M_r	pK_a (nejkyselejší)	Vzhled	Rozpustnost ve vodě při 25 °C /mg·l⁻¹
382,9	8,68	Bílý prášek	16,8

3.6 Separační metody využívané pro separaci vybraných diuretik

Nejčastější metodou pro separaci námi vybraných diuretik je reverzní HPLC, která využívá jako stacionární fáze C8 nebo C18 kolony. Mobilní fáze je ve většině analýz tvořena organickým rozpouštědlem (methanol nebo acetonitril) v kombinaci s vodou nebo fosforečnanovým pufrem. Pro detekci se využívají spektrometrické metody v UV oblasti.

Diuretika jsou analyzovaná ze směsi látek a matricí může být např. moč při podezření z dopingu (sportovci si snižují svou tělesnou hmotnost vyloučením vody), výživové doplňky pro hubnutí, lékové tablety nebo hovězí mléko.^{33–37}

Analýza butizidu, bendroflumethiazidu, chlorthalidonu a mefrusidu byla provedena s využitím chirálních separačních kolon Chiralpak, Chiralcel a Chirobiotic. Tyto chirální látky byly s dalšími farmaceutickými sloučeninami použity pro zkoumání eantioselektivního potenciálu dvou imobilizovaných chirálních fází pro normální a reverzní separaci. Výsledky literární rešerše jsou shrnuty v Tab. 7, Tab. 8 a Tab. 9.

Tab. 7 Souhrn metod použitých pro separaci butizidu³⁸, chlorthalidonu^{33,39}, bendroflumethiazidu³³ a trichlormethiazidu³³

Analyt	<i>Butizid</i>	<i>Chlorthalidon</i>	<i>Bendroflumethiazid, chlorthalidon, trichlormethiazid</i>
Metoda	HPLC	HPLC	HPLC
Detekce	UV při 271 nm	UV při 275 nm	UV při 274 nm
Použitá kolona	LiChrosorb RP-8	Kyanopropyllová	ODS2
Mobilní fáze	ACN:0,05 mol·dm ⁻³ fosforečnanový pufr	10 mmol·dm ⁻³ KH ₂ PO ₄ :MeOH	0,055 M SDS:1-propanol
Poměr MF	45:55	75:25	92:8

Tab. 8 Souhrn metod použitých pro separaci chlorthalidonu a mefrusidu ve směsi⁴⁰, mefrusidu³⁵ a trichlormethiazidu^{36,37}

Analyt	<i>Chlorthalidon, mefrusid</i>	<i>Trichlormethiazid</i>	<i>Mefrusid</i>
Metoda	HPLC	HPLC	HPLC
Detekce	UV při 204, 223 a 245 nm	UV při 235 a 260 nm	UV při 225 nm
Použitá kolona	Lichrospher C-18 ®	Wakosil ODS 5C18	Polymerní
Mobilní fáze	voda:TEA: H ₃ PO ₄ :ACN	voda:ACN	ACN nebo ACN-THF (obj. 2:1): fosforečnanový pufr (pH 3,0)
Poměr MF	Různé poměry	Gradient	30:70
			55:45

Tab. 9 Souhrn metod použitých pro separaci butizidu, bendroflumethiazidu, chlorthalidonu a mefrusidu ve směsi^{41,42}

Analyt	<i>Butizid, Bendroflumethiazid, Chlorthalidon, Mefrusid</i>			
Metoda	RP-HPLC	NP-HPLC	HPLC	
Detekce	UV při 220 a 245 nm		UV při 254 nm	UV při 230 m
Použitá kolona	CHIRALPAK IA	CHIRALPAK IB	Chiralcel OD-RH Chiralcel OJ-RR	Chirobiotic T
Mobilní fáze	HEX:IPA:TEA (TFA)	MeOH(ACN):100 mM KPF ₆ (10 mmol·dm ⁻³ octan amonný)	Voda nebo vodný roztok 1,0 mol·dm ⁻³ NaClO ₄ nebo 0,2 mol·dm ⁻³ NaH ₂ PO ₄ / H ₃ PO ₄ nebo 0,5 M HClO ₄ -NaClO ₄ v kombinaci s ACN	Voda nebo 1,0% nebo 0,1% TEAA (pH 4,1) s MeOH nebo ACN
Poměr MF	Různé poměry	Různé poměry	Různé množství ACN	Různé poměry

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

V této bakalářské práci byly použity chemikálie, které jsou shrnuty v Tab. 10.

Tab. 10 Použité chemikálie

Chemikálie	Čistota	Výrobce	Stát
Acetonitril	≥ 99,8 %	Avantor	USA
Bendroflumethiazid	analytical standard	Supelco	USA
Butizid	analytical standard	Supelco	USA
Chlorthalidon	≥98 % (HPLC)	Sigma Aldrich	USA
Mefrusid	≥95 %	Boc Sciences	USA
Methanol (pro HPLC)	≥ 99,9 %	Sigma Aldrich	Německo
NaH ₂ PO ₄ (bezvodý)	p.a.	Lachema	Česká republika
NaOH	p.a.	Lach:ner	Česká republika
Trichlormethiazid	≥98 %	Sigma Aldrich	USA

4.2 Použité přístroje a pomůcky

K měření byl používán kapalinový chromatograf Waters Alliance 2690 s detektorem Waters 996 PDA (Waters, USA). Deionizovaná voda byla připravena pomocí systému Milli Pore (Francie). K rozpouštění látek byla používána ultrazvuková lázeň Ultrasonic compact cleaner 1,25 L (Danae vision, Česká republika). Pro navážení chemikálii sloužila analytická váha NIMBUS 164i od výrobce Adam Equipment (USA). K měření pH pufru použitého jako mobilní fáze byl používán pH metr AD1020 od výrobce Adwa (Maďarsko). K separaci byla použita kolona PhenoSphere™ 5μm SAX 80 Å s rozměry 150 x 4,6 mm (Phenomenex, USA). Nosičem ionexové kvartérní aminové skupiny byl silikagel. Pro tvorbu separačních metod, sběr dat a následné vyhodnocování chromatogramů byl použit software Empower 3 Chromatography Data Software od firmy Waters (USA). Grafy byly zpracovány v programu Excel Microsoft. Pro vyhodnocení naměřených dat metodou LSER byl použit statistický software NCSS (USA).

4.3 Postup přípravy

Příprava mobilní fáze

Jako mobilní fáze byl použit fosforečnanový pufr. Pro přípravu fosforečnanového pufru o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bylo odváženo asi přesně 6,9 g NaH_2PO_4 . Navážka byla kvantitativně převedena do 500 ml odměrné baňky, která byla deionizovanou vodou doplněna po rysku. Pro podpoření rozpuštění byl pufr umístěn do ultrazvukové lázně po dobu 10 minut. Po rozpuštění všech částic byl roztok přefiltrován pomocí vakuové filtrační aparatury přes membránový filtr o velikosti pórů $0,45 \mu\text{m}$. Podle potřebné koncentrace v testované metodě byl tento pufr dále ředěn. Nakonec bylo pomocí $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH upraveno pH z původní hodnoty 4,5 na požadovanou hodnotou opět podle testované metody.

Příprava vzorků diuretik

Do vialek bylo odváženo asi přesně 0,1 mg vzorku, který byl následně rozpuštěn v 1,5 ml rozpouštědla. Rozpouštědlem byla mobilní fáze, ve které probíhala separace. Pokud MF neobsahovala organickou složku, bylo do rozpouštědla pro diuretika přidáno 5 obj.% methanolu ke zlepšení rozpustnosti vzorků. Pro dokonalé rozpuštění látky bylo zapotřebí vzorky umístit do ultrazvukové lázně po dobu alespoň 20 min. Poslední krokem před měřením byla filtrace pomocí filtračních nástavců na injekční stříkačky o velikosti pórů 0,45 mikrometrů.

Příprava látek pro LSER

LSER analyty ze zadaného souboru byly připraveny odvážením do vialek v rozsahu hmotnosti 0,5 - 1,5 mg a byly rozpuštěny v 1,5 ml mobilní fázi tvořené methanolem, popřípadě acetonitrilem, a fosforečnanovým pufrem ($0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 6,0) v objemovém poměru 10:90.

4.4 Podmínky měření diuretik

Při hledání vhodných podmínek pro separaci thiazidových diuretik na testované koloně byl jako mobilní fáze použit $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosforečnanový pufr s hodnotou pH 7,0 nejdříve samotný, potom v různých objemových poměrech s organickou fází, kterou byl buď methanol nebo acetonitril.

Vliv koncentrace fosforečnanového pufru na separaci studovaných diuretik byl sledován pro hodnoty $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, vliv pH pufru na retenční chování byl sledován v rozsahu hodnot 6,0, 7,0 a 8,0. Parametry shodné při všech testovaných podmínkách byl průtok mobilní fáze 0,8 ml/min a teplota kolony 30 °C. Vlnová délka

spektrofotometrické detekce byla odečtena v maximu absorpčních spekter příslušných látek, pro butizid a trichlormethiazid 225 nm a pro ostatní analyty 210 nm.

4.5 Podmínky měření LSER analytů

Retenční chování testovacích LSER analytů bylo měřeno v mobilní fázi, která poskytovala nejlepší výsledky pro analýzu všech studovaných diuretik, tedy v mobilní fázi složené z $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosforečnanového pufru, pH 6,0 a methanolu, v objemovém poměru 90:10. Pro vyhodnocení vlivu použitého organického modifikátoru na chromatografický systém z pohledu LSER modelu, bylo měření LSER analytů provedeno i v mobilní fázi obsahující 10 objemových % acetonitrilu

5 Výsledky a diskuze

V rámci této bakalářské práce byly nejdříve optimalizovány separační podmínky pro analýzu vybraných diuretik. Cílem bylo najít takovou mobilní fázi, ve které by bylo dosaženo co nejlepší separace diuretik na zvolené aniontově výměnné koloně PhenoSphere SAX. Byl studován vliv pH a koncentrace použitého fosforečnanového pufru na retenci diuretik, dále vliv druhu a množství organického modifikátoru v mobilní fázi.

V mobilní fázi, která poskytovala v rámci našeho experimentálního uspořádání nejlepší separaci, byla provedena charakterizace stacionární fáze metodou LSER.

Jako startovní podmínky byly zvoleny tyto: pH mobilní fáze 7,0, koncentrace pufru $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bez přítomnosti organického modifikátoru. Píky analytů naměřené za těchto experimentálních podmínek byly deformované, rozštěpené, důvodem byla nízká rozpustnost analytů v použité vodné MF. Z důvodu špatné rozpustnosti diuretik v čistém pufru bylo nutné přidat organický modifikátor. Jeho množství potřebné pro kvalitní analýzu bylo jedním z testovaných parametrů v rámci hledání vhodné mobilní fáze pro separaci.

5.1 Vliv pH mobilní fáze na retenci diuretik

Podmínky analýzy byly ponechány stejné, jako pro první měření (pH MF 7,0, koncentrace pufru $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Pro lepší rozpustnost analytů byla mobilní fáze složena z fosforečnanového pufru s přítomností organického modifikátoru methanolu v objemovém poměru 90:10. Při použití těchto podmínek eluoval butizid, chlorthalidon i mefrusid v téměř totožných retenčních časech, bendroflumethiazid a trichlormethiazid se zadržovaly déle a bylo možné jejich oddělení. Retenční časy separovaných diuretik jsou shrnuty v Tab. 11.

Změnou pH mobilní fáze na hodnotu 6,0 došlo u trichlormethiazidu k jeho menší zadržnosti v koloně, tedy retenční čas se snížil. U ostatních diuretik byly změny retenčních časů velmi malé, mohlo dojít k adsorpci analytů na silikagelový nosič.

Výsledky naměřené pro mobilní fázi s hodnotou pH 8,0 nebyly přínosné a také hrozilo poškození sorbentu vlivem rozpouštění silikagelového nosiče, proto nebylo toto pH mobilní fáze dále testováno.

Pro další optimalizační kroky byla použita mobilní fáze o pH 6,0, a to s ohledem na kratší retenční časy analytů a také s ohledem na lepší tvar píku analyzovaných látek.

Tab. 11 Retenční parametry (retenční čas t_R a výška píku h) analytů při změně pH pufru

Složení mobilní fáze 0,05 M NaH_2PO_4 :MeOH 90:10 (v/v)				
pH pufru	6,0		7,0	
Látka	t_R/min	h/V	t_R/min	h/V
Butizid	2,719	0,09	2,713	0,11
Chlorthalidon	2,741	0,28	2,762	0,44
Mefrusid	2,779	0,04	2,731	0,10
Trichlormethiazid	3,020	0,23	3,533	0,21
Bendroflumethiazid	3,190	0,05	3,251	0,14

5.2 Vliv množství methanolu v mobilní fázi na retenci diuretik

Druhým měněným parametrem při optimalizaci složení mobilní fáze pro analýzu studovaných diuretik bylo množství organického modifikátoru v mobilní fázi. Koncentrace použitého pufru byla shodná jako při předchozím měření, tedy $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pro pH mobilní fáze byla na základě předchozích měření zvolena hodnota 6,0.

V Tab. 12 jsou shrnuty retenční parametry analytů pro mobilní fáze s objemovým poměrem methanolu a pufru 5:95; 8:92 a 10:90. S nárůstem obsahu methanolu v mobilní fázi lze pozorovat menší zadržování látek v koloně. Při 5% obsahu methanolu v pufru byl pík bendroflumethiazidu velmi rozmytý a nebylo možné určit jeho výšku ani retenční čas. Tak malý obsah organické fáze v MF zřejmě znesnadnil rozpustnost daného analytu, proto nebyly tyto podmínky využity při dalších optimalizačních krocích. Jako nejvhodnější mobilní fáze pro další měření byla zvolena ta s 10 objemovými % organického modifikátoru methanolu. Při použití této MF měly píky analyzovaných diuretik nejlepší tvar a také největší výšku.

Tab. 12 Retenční parametry (retenční čas t_R a výška píku h) analytů při změně obsahu metanolu v MF

Složení mobilní fáze 0,05 M NaH_2PO_4 (pH 6,0) :MeOH (v/v)	95:5		92:8		90:10	
Látka	t_R/min	h/V	t_R/min	h/V	t_R/min	h/V
Butizid	2,978	0,16	2,838	0,16	2,769	0,17
Chlorthalidon	2,977	0,65	2,843	0,70	2,773	0,75
Mefrusid	3,332	0,09	3,066	0,05	2,953	0,11
Trichlormethiazid	3,093	0,32	3,001	0,38	2,951	0,38
Bendroflumethiazid	X	X	3,306	0,05	3,187	0,04

5.3 Vliv koncentrace fosforečnanového pufru v mobilní fázi na retenci diuretik

Třetím parametrem, který byl testován, byla koncentrace fosforečnanového pufru v mobilní fázi. Z předchozích měření byly jako nejvhodnější podmínky zvoleny: pH fosforečnanového pufru 6,0 a množství organického modifikátoru 10 obj. %. Koncentrace pufru v MF byla v prvním případě zvolena $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, v druhém případě $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a třetí proměřená koncentrace byla $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Retenční parametry pro tyto podmínky jsou shrnuty v Tab. 13. S výjimkou trichlormethiazidu se retenční časy analytů změnily jen málo. Retenční čas trichlormethiazidu se při koncentraci MF $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ zvětšil, tedy došlo k delšímu zadržení této látky v koloně. Jelikož cílem optimalizace složení mobilní fáze bylo dosáhnout podmínek, při kterých bude možné oddělit analyty ze směsi, bylo toto zdržení přínosné, a proto byla koncentrace pufru $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ zvolena jako nejvhodnější. Pro butizid a bendroflumethiazid byly v chromatogramech detegovány dva píky, což s největší pravděpodobností zapříčinilo rozklad zásobních roztoků vzorků, které byly používány po delší časový úsek.

Tab. 13 Retenční parametry (retenční čas t_R a výška píku h) analytů při změně koncentrace pufru

Složení mobilní fáze NaH_2PO_4 (pH 6,0):MeOH 90:10 (v/v)						
Koncentrace NaH_2PO_4 v MF/ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,1		0,05		0,025	
Látka	t_R/min	h/V	t_R/min	h/V	t_R/min	h/V
Butizid	2,824	0,06	2,769	0,17	2,645;2,814	0,03;0,06
Chlorthalidon	2,791	0,38	2,773	0,75	2,772	0,38
Mefrusid	3,043	0,23	2,953	0,11	2,996	0,25
Trichlormethiazid	2,868	0,25	2,951	0,38	3,297	0,25
Bendroflumethiazid	2,589;3,177	0,02;0,04	3,187	0,04	2,597;3,165	0,04;0,06

5.4 Vliv druhu organického modifikátoru v mobilní fázi na retenci diuretik

Při hledání nejvhodnějších podmínek pro separaci analytů byl sledován i vliv druhu organického modifikátoru, namísto methanolu byl použit acetonitril jako organická složka mobilní fáze. Zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi ($0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, pH 6,0) bylo zvoleno ve stejných objemových poměrech jako v případě methanolu, tedy 5, 8 a 10 obj. % acetonitrilu. Retenční časy diuretik naměřené v tomto optimalizačním kroku, jsou shrnuty v Tab. 14. Stejně jako v případě methanolu lze pozorovat pokles retence analytů s rostoucím množstvím ACN v mobilní fázi. Lepší rozlišení mezi píky analytů bylo dosaženo při použití

methanolu jako organického modifikátoru v MF, také byly získány lepší tvary píků a vyšší píky diuretik v porovnání s MF obsahující acetonitril.

Tab. 14 Retenční parametry (retenční čas t_R a výška píku h) analytů při změně obsahu acetonitrilu v MF

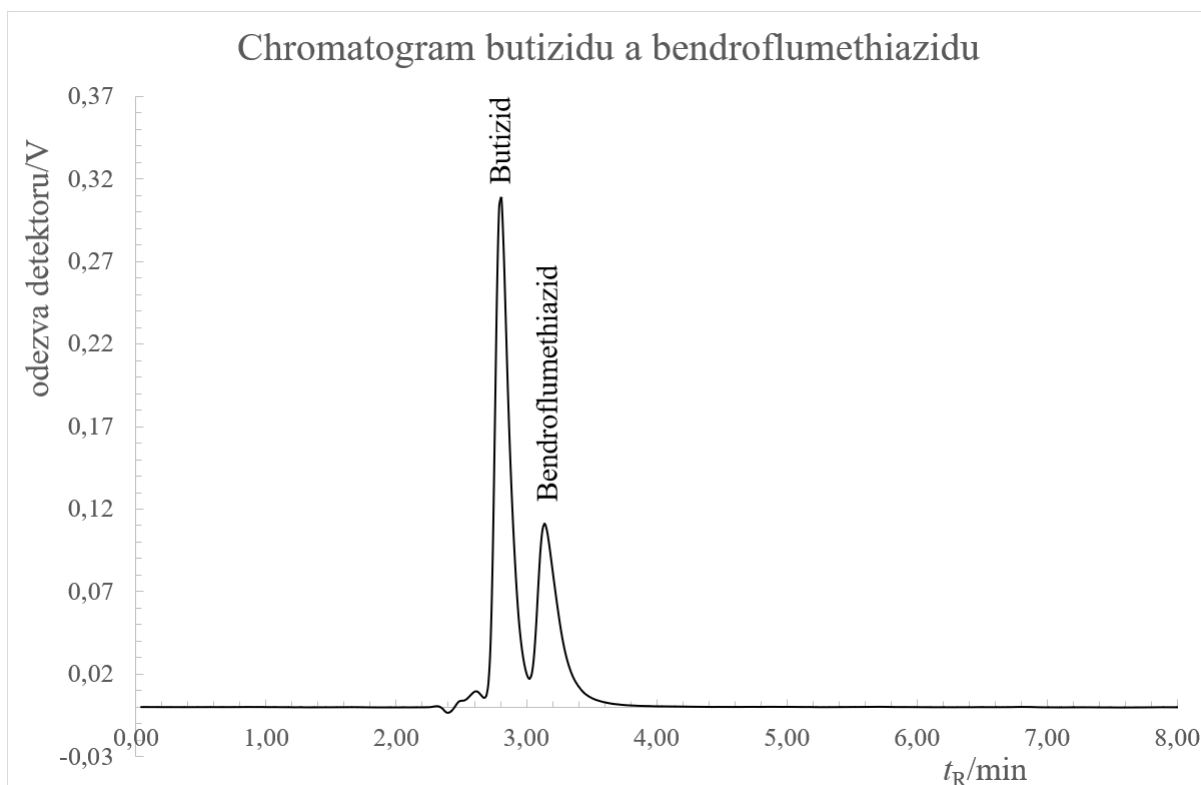
Složení mobilní fáze 0,025 M NaH ₂ PO ₄ (pH 6,0):ACN (v/v)		95:5		92:8		90:10	
Látka		t_R/min	h/V	t_R/min	h/V	t_R/min	h/V
Butizid		2,746	0,15	2,627	0,17	2,559	0,18
Chlorthalidon		2,734	0,56	2,621	0,64	2,583	0,25
Mefrusid		2,939	0,11	2,772	0,13	2,617	0,12
Trichlormethiazid		3,072	0,40	2,926	0,48	2,901	0,38
Bendroflumethiazid		3,043	0,15	2,838	0,11	2,772	0,18

Jako nejvhodnější podmínky pro separaci diuretik byly zvoleny tyto:

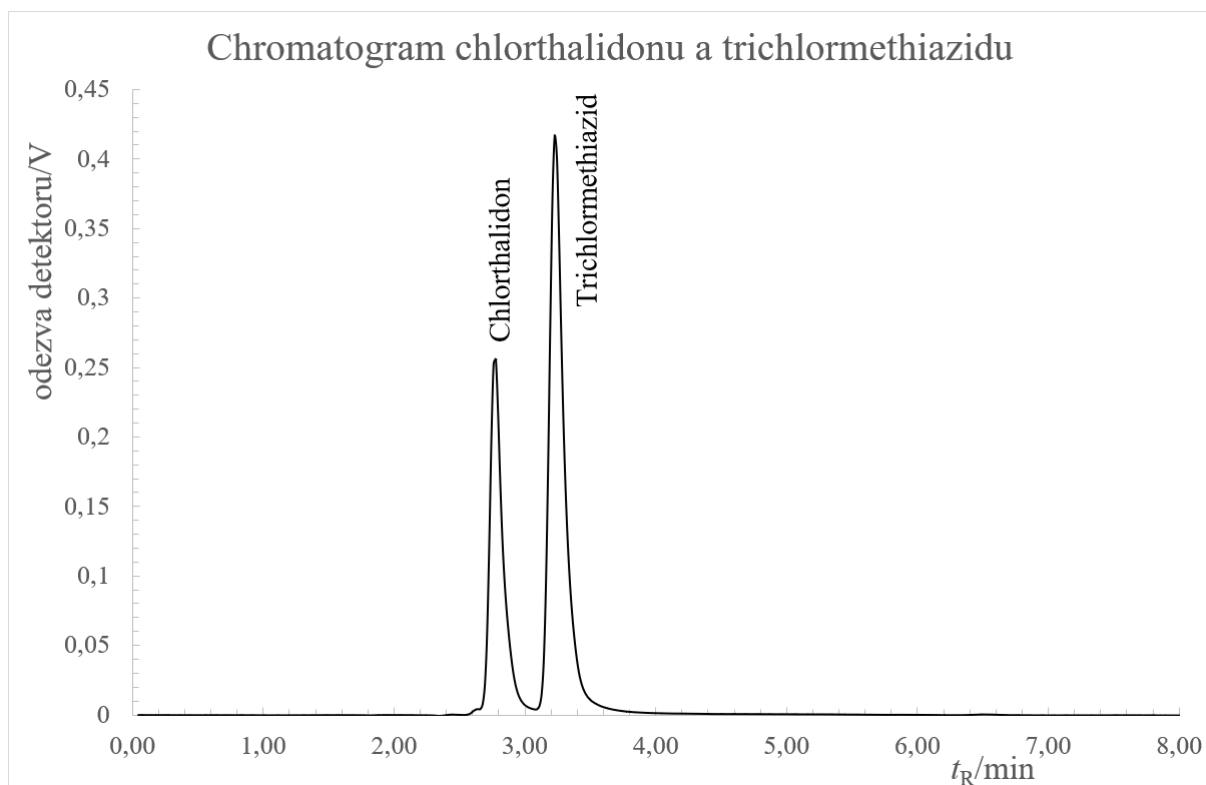
Fosforečnanový pufr (NaH₂PO₄) o pH **6,0**, koncentraci pufru **0,025 mol·dm⁻³** v objemovém poměru organická fáze methanol:fosforečnanový pufr **10:90**. Takto vytvořená metoda byla použita pro separaci analytů diuretik ze směsi, a také k proměření retenčních parametrů analytů pro charakterizaci stacionární fáze pomocí metody LSER. Po vyhodnocení vlivu organického modifikátoru na chování analytů a SF, byla LSER měření provedena, za identických podmínek jako v případě methanolu, i s acetonitrilem.

5.5 Separace analytů ze směsi

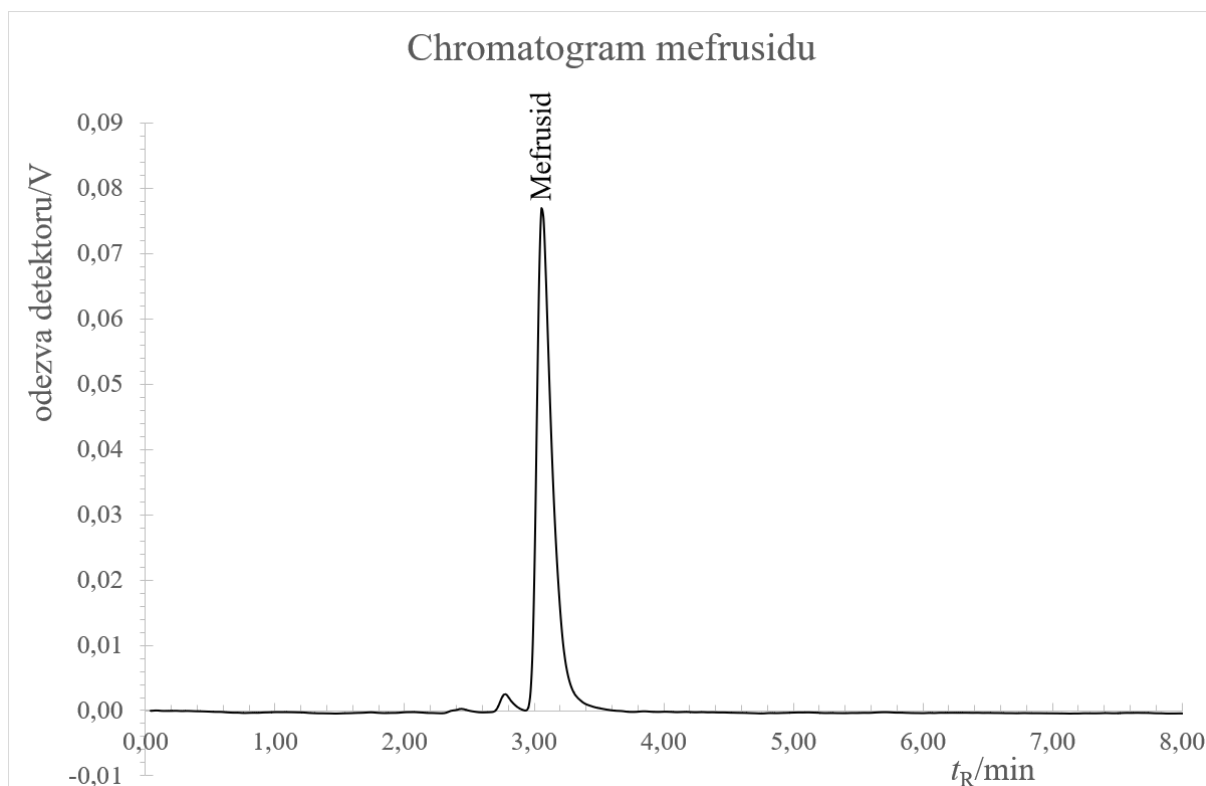
Pro separaci směsných vzorků analytů byly připraveny dvě směsi. První směs obsahovala butizid a bendroflumethiazid. V druhé směsi byl chlorthalidon, a trichlormethiazid. Mefrusid byl nakonec měřen samostatně. Tato složení byla zvolena na základě odlišné zadržnosti analytů v koloně a také vzhledem k podobné odezvě použitého detektoru. Výsledné chromatogramy separace směsí diuretik pro mobilní fázi s obsahem methanolu jsou zobrazeny na Obr. 10, Obr. 11 a Obr. 12. Chromatogramy separace směsí diuretik pro mobilní fázi s obsahem acetonitrilu jsou zobrazeny na Obr. 13, Obr. 14 a Obr. 15. Z uvedených chromatogramů je zřejmé, že lepší výsledky byly naměřeny v mobilní fázi obsahující methanol jako organický modifikátor. Během 4 minut bylo možné rozdělit chlorthalidon a trichlormethiazid až na základní linii, také rozdělení butizidu a bendroflumethiazidu bylo uspokojivé.



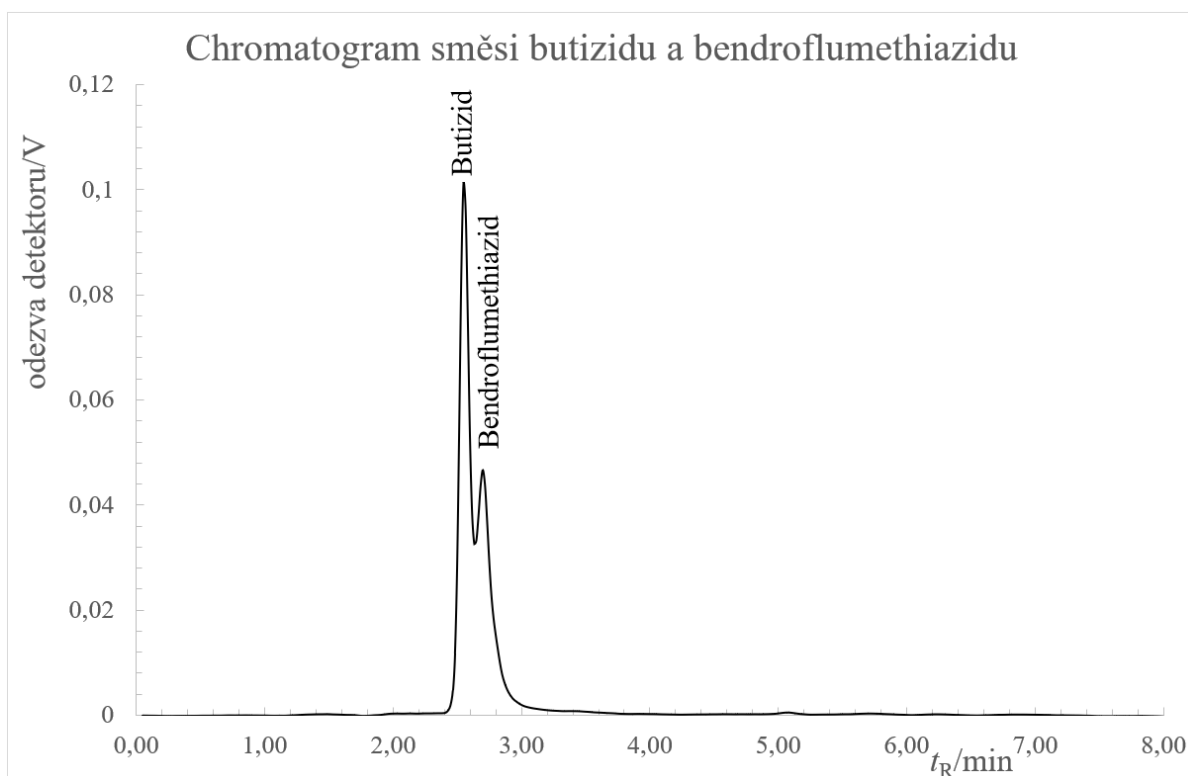
Obr. 10 Separace butizidu a bendroflumethiazidu na koloně PhenoSphere SAX; mobilní fáze složená z methanolu a fosforečnanového pufru o koncentraci $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,0 v objemovém poměru 10:90; objem nástriku vzorku $5,00 \text{ } \mu\text{l}$; průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml/min}$; detekční vlnová délka 275 nm ; teplota kolony $30 \text{ } ^\circ\text{C}$



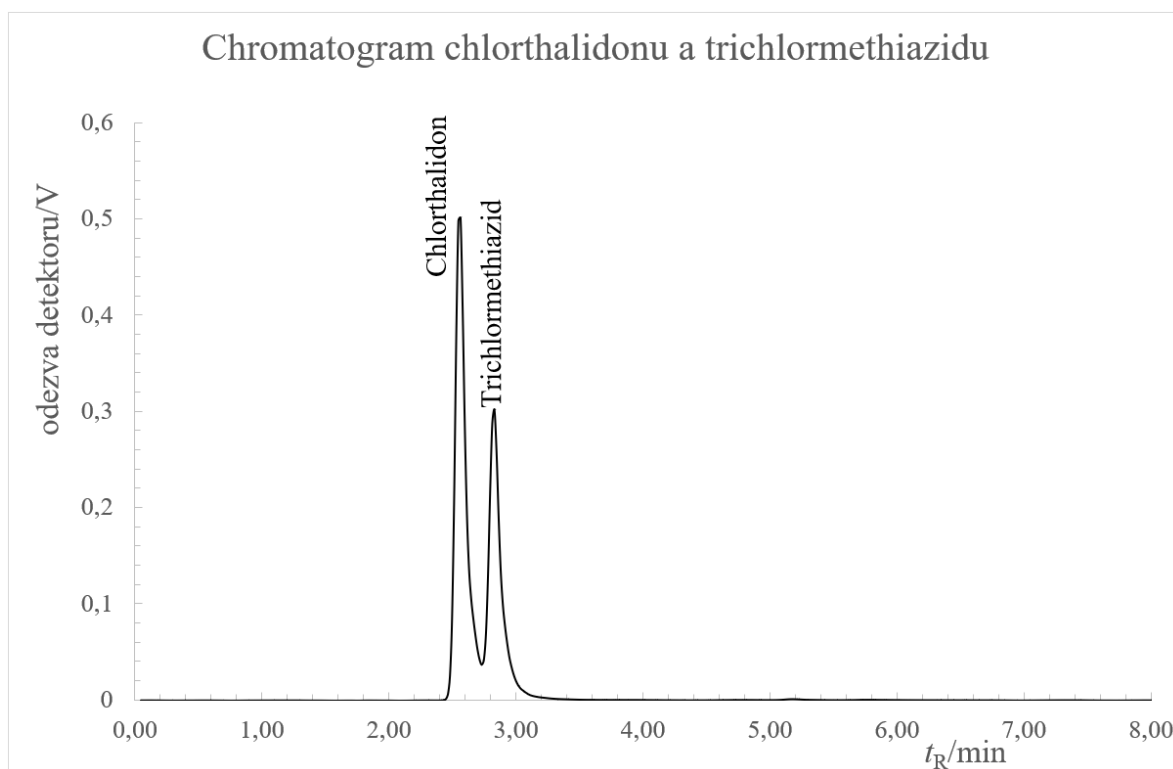
Obr. 11 Separace chlorthalidonu a trichlormethiazidu na koloně PhenoSphere SAX; mobilní fáze složená z methanolu a fosforečnanového pufru o koncentraci $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,0 v objemovém poměru 10:90; objem nástřiku vzorku $5,00 \text{ } \mu\text{l}$; průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml/min}$; detekční vlnová délka 225 nm ; teplota kolony $30 \text{ } ^\circ\text{C}$



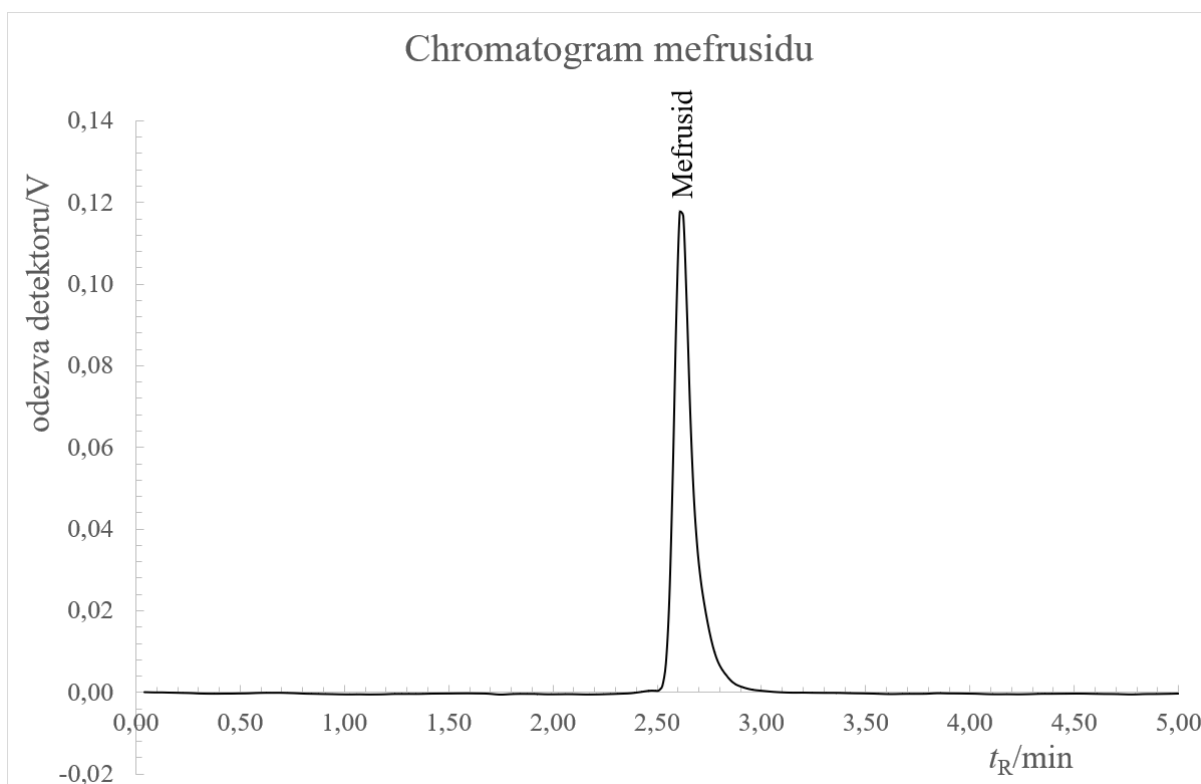
Obr. 12 Separace mefrusidu koloně PhenoSphere SAX; mobilní fáze složená z methanolu a fosforečnanového pufru o koncentraci $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,0 v objemovém poměru 10:90; objem nástřiku vzorku $5,00 \text{ } \mu\text{l}$; průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml/min}$; detekční vlnová délka 210 nm ; teplota kolony $30 \text{ } ^\circ\text{C}$



Obr. 13 Separace butizidu a bendroflumethiazidu na koloně PhenoSphere SAX; mobilní fáze složená z acetonitrilu a fosforečnanového pufru o koncentraci $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,0 v objemovém poměru 10:90; objem nástřiku vzorku $5,00 \text{ } \mu\text{l}$; průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml/min}$; detekční vlnová délka 275 nm ; teplota kolony 30°C



Obr. 14 Separace chlorthalidonu a trichlormethiazidu na koloně PhenoSphere SAX; mobilní fáze složená z acetonitrilu a fosforečnanového pufru o koncentraci $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,0 v objemovém poměru 10:90; objem nástřiku vzorku $5,00 \text{ } \mu\text{l}$; průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml/min}$; detekční vlnová délka 225 nm ; teplota kolony 30°C .



Obr. 15 Separace mefrusidu koloně PhenoSphere SAX; mobilní fáze složená z acetonitrilu a fosforečnanového pufru o koncentraci $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,0 v objemovém poměru 10:90; objem nástřiku vzorku $5,00 \text{ } \mu\text{l}$; průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml/min}$; detekční vlnová délka 210 nm ; teplota kolony $30 \text{ } ^\circ\text{C}$

5.6 Analýza LSER modelových analytů

Analýza modelových analytů proběhla v mobilní fázi, kterou tvořil fosforečnanový pufr a organický modifikátor v objemovém poměru 90:10. Pro analýzu byly použity dvě mobilní fáze, které se lišily typem organické složky – methanol, acetonitril. Vzorky byly naváženy do vialek a rozpuštěny v rozpouštědle se složením odpovídajícím použité mobilní fázi. V Tab. 15 jsou shrnuty naměřené retenční faktory a LSER deskriptory pro modelové analyty v mobilní fázi tvořené fosforečnanovým pufrem a acetonitrilem. V Tab. 16 jsou shrnuty naměřené retenční faktory a LSER deskriptory pro modelové analyty v mobilní fázi tvořené fosforečnanovým pufrem a methanolem jako organickým modifikátorem.

Hodnoty deskriptorů D^+ a D^- byly vypočítány na základě rovnic (9) a (10) na straně 8. Ostatní molekulové deskriptory byly dohledány v literatuře. Mrtvý čas kolony, který byl použit k výpočtu retenčního faktoru, byl určen z retenčního času systémového píku jako průměr z 10 hodnot. Měření retenčního chování LSER analytů bylo opakováno 2x pro kontrolu možných chyb.

Tab. 15 Souhrn LSER deskriptorů, retenčních časů t_R a retenčního faktoru k pro modelové analyty změřené pro mobilní fázi s acetonitrilem

<i>Látka</i>	<i>t_R/min</i>	<i>k</i>	<i>log k</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>V</i>	<i>D_{6,0}⁻</i>	<i>D_{6,0}⁺</i>
<i>Adenin</i>	2,835	0,23	-0,64	1,68	1,80	0,70	1,13	0,923	0,00	0,00
<i>Cytosin</i>	2,619	0,13	-0,87	1,43	1,90	0,60	1,02	0,793	0,00	0,00
<i>Uracil</i>	2,474	0,07	-1,14	0,81	1,00	0,44	1,00	0,752	0,00	0,00
<i>Uridin</i>	2,382	0,03	-1,49	1,88	2,35	0,90	2,29	1,582	0,00	0,00
<i>Fenylalanin</i>	2,585	0,12	-0,92	0,95	1,39	0,78	1,02	1,313	1,00	1,00
<i>Tyrosin</i>	2,545	0,10	-0,99	1,18	1,60	1,28	1,29	1,372	1,00	1,00
<i>Tyramin</i>	2,213	-0,04		1,01	1,17	0,71	0,94	1,157	0,00	1,00
<i>Tryptofan</i>	2,782	0,21	-0,69	1,62	1,80	1,09	1,23	1,543	1,00	1,00
<i>Xantin</i>	2,574	0,12	-0,94	1,50	1,60	0,97	1,07	0,941	0,01	0,00
<i>Theofylin</i>	2,51	0,09	-1,06	1,50	1,60	0,54	1,34	1,222	0,01	0,00
<i>Kofein</i>	2,51	0,09	-1,06	1,50	1,60	0,00	1,33	1,364	0,00	0,00
<i>Benzen</i>	2,635	0,14	-0,85	0,61	0,52	0,00	0,14	0,716	0,00	0,00
<i>Butylbenzen</i>	3,139	0,36	-0,44	0,60	0,51	0,00	0,15	1,280	0,00	0,00
<i>Bifenyl</i>	3,286	0,42	-0,37	1,36	0,99	0,00	0,26	1,324	0,00	0,00
<i>Antracen</i>	4,949	1,14	0,06	2,29	1,34	0,00	0,26	1,454	0,00	0,00
<i>Pyren</i>	7,47	2,24	0,35	2,81	1,71	0,00	0,29	1,585	0,00	0,00
<i>Fenol</i>	2,623	0,14	-0,86	0,81	0,89	0,60	0,30	0,775	0,00	0,00
<i>Resorcinol</i>	2,63	0,14	-0,86	0,98	1,11	1,09	0,52	0,834	0,00	0,00
<i>Floroglucinol</i>	2,614	0,13	-0,88	1,36	1,12	1,40	0,82	0,893	0,00	0,00
<i>p-kresol</i>	2,644	0,15	-0,84	0,82	0,87	0,57	0,31	0,916	0,00	0,00
<i>p-nitrofenol</i>	3,06	0,33	-0,49	1,07	1,72	0,82	0,26	0,949	0,08	0,00
<i>Kyselina benzoová</i>	5,029	1,18	0,07	0,73	0,90	0,59	0,40	0,932	0,99	0,00
<i>Kyselina 4-hydroxybenzoová</i>	4,915	1,13	0,05	0,93	0,90	0,81	0,56	0,990	0,98	0,00
<i>Kyselina 2,6- dihydroxybenzoová</i>	4,794	1,08	0,03	0,73	0,86	0,72	0,64	1,214	1,00	0,00
<i>Kyselina 4-aminobenzoová</i>	5,177	1,24	0,09	1,08	1,65	0,94	0,60	1,032	0,94	0,00
<i>Kyselina salicylová</i>	5,002	1,17	0,07	0,89	0,84	0,71	0,38	0,990	1,00	0,00
<i>Kyselina acetylsalicylová</i>	4,66	1,02	0,01	0,78	0,80	0,49	1,00	1,288	1,00	0,00
<i>Kyselina skořicová</i>	5,363	1,32	0,12	1,14	1,00	0,58	0,57	1,171	0,98	0,00
<i>Kyselina mandlová</i>	4,49	0,95	-0,02	0,90	1,05	0,74	0,89	1,131	0,99	0,00
<i>Kyselina o-kumarová</i>	5,704	1,47	0,17	1,13	1,39	1,07	0,79	1,229	0,99	0,00

<i>Látka</i>	<i>t_R/min</i>	<i>k</i>	<i>log k</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>V</i>	<i>D</i> ⁻ _{6,0}	<i>D</i> ⁺ _{6,0}
<i>Kyselina p-kumarová</i>	5,167	1,24	0,09	1,13	1,39	1,07	0,79	1,229	0,99	0,00
<i>Kyselina 4-hydroxyfenyloctová</i>	4,841	1,10	0,04	0,94	1,32	0,97	0,78	1,131	0,99	0,00
<i>Anilin</i>	2,679	0,16	-0,79	0,96	0,96	0,26	0,41	0,816	0,00	0,04
<i>o-Toluidin</i>	2,723	0,18	-0,74	0,97	0,92	0,23	0,45	0,957	0,00	0,03
<i>p-toluidin</i>	2,706	0,17	-0,76	0,92	0,95	0,23	0,45	0,957	0,00	0,09
<i>Chlorobenzen</i>	2,716	0,18	-0,75	0,72	0,65	0,00	0,07	0,839	0,00	0,00
<i>1,2,3-Trichlorobenzen</i>	3,004	0,30	-0,52	1,03	0,86	0,00	0,00	1,084	0,00	0,00
<i>4-Chlorofenol</i>	2,656	0,15	-0,82	0,92	1,08	0,67	0,21	0,898	0,00	0,00
<i>3-Hydroxybenzaldehyd</i>	2,583	0,12	-0,92	0,99	1,38	0,74	0,40	0,932	0,00	0,00
<i>Benzamid</i>	2,616	0,13	-0,87	0,99	0,50	0,49	0,67	0,973	0,00	0,00
<i>2-Naftol</i>	3,101	0,34	-0,46	1,52	1,08	0,61	0,40	1,144	0,00	0,00
<i>Hydrochinon</i>	2,555	0,11	-0,97	1,00	1,00	1,16	0,60	0,834	0,00	0,00
<i>Dibenzothiofen</i>	4,321	0,87	-0,06	1,96	1,31	0,00	0,18	1,379	0,00	0,00
<i>Pyridin</i>	2,964	0,28	-0,55	0,63	0,84	0,00	0,52	0,675	0,00	0,12
<i>2-Aminopyridin</i>	2,805	0,22	-0,67	0,98	1,10	0,32	0,63	0,775	0,00	0,87
<i>4-Aminopyridin</i>	2,461	0,07	-1,18	0,90	1,21	0,23	0,71	0,775	0,00	1,00
<i>Kyselina šťaveľová</i>	3,42	0,48	-0,32	0,48	0,64	1,37	0,67	0,539	1,99	0,00
<i>Kyselina citrónová</i>	3,84	0,67	-0,18	0,61	1,50	1,63	1,33	1,240	2,76	0,00

Tab. 16 Souhrn LSER deskriptorů, retenčních časů t_R a retenčního faktoru k pro modelové analyty změřené pro mobilní fázi s methanolem

Látka	t_R/min	k	$\log k$	E	S	A	B	V	$D^{-6,0}$	$D^{+6,0}$
Adenin	2,925	0,55	-0,26	1,68	1,80	0,70	1,13	0,923	0,00	0,00
Cytosin	2,702	0,43	-0,37	1,43	1,90	0,60	1,02	0,793	0,00	0,00
Uracil	2,505	0,33	-0,49	0,81	1,00	0,44	1,00	0,752	0,00	0,00
Uridin	2,424	0,28	-0,55	1,88	2,35	0,90	2,29	1,582	0,00	0,00
Fenylalanin	2,676	0,42	-0,38	0,95	1,39	0,78	1,02	1,313	1,00	1,00
Tyrosin	2,574	0,36	-0,44	1,18	1,60	1,28	1,29	1,372	1,00	1,00
Tyramin	2,383	0,26	-0,58	1,01	1,17	0,71	0,94	1,157	0,00	1,00
Tryptofan	2,887	0,53	-0,28	1,62	1,80	1,09	1,23	1,543	1,00	1,00
Xantin	2,594	0,37	-0,43	1,50	1,60	0,97	1,07	0,941	0,01	0,00
Theofylin	2,577	0,36	-0,44	1,50	1,60	0,54	1,34	1,222	0,01	0,00
Kofein	2,710	0,43	-0,36	1,50	1,60	0,00	1,33	1,364	0,00	0,00
Benzen	2,000	0,06	-1,24	0,61	0,52	0,00	0,14	0,716	0,00	0,00
Butylbenzen	3,601	0,91	-0,04	0,60	0,51	0,00	0,15	1,280	0,00	0,00
Bifenyl	4,017	1,13	0,05	1,36	0,99	0,00	0,26	1,324	0,00	0,00
Antracen	9,082	3,81	0,58	2,29	1,34	0,00	0,26	1,454	0,00	0,00
Fenol	2,686	0,42	-0,38	0,81	0,89	0,60	0,30	0,775	0,00	0,00
Resorcinol	2,672	0,41	-0,38	0,98	1,11	1,09	0,52	0,834	0,00	0,00
Floroglucinol	2,671	0,41	-0,38	1,36	1,12	1,40	0,82	0,893	0,00	0,00
<i>p</i>-kresol	2,759	0,46	-0,34	0,82	0,87	0,57	0,31	0,916	0,00	0,00
<i>p</i>-nitrofenol	2,759	0,46	-0,34	0,82	0,87	0,57	0,31	0,916	0,08	0,00
Kyselina benzoová	4,827	1,55	0,19	0,73	0,90	0,59	0,40	0,932	0,99	0,00
Kyselina 4-hydroxybenzoová	4,487	1,37	0,14	0,93	0,90	0,81	0,56	0,990	0,98	0,00
Kyselina 2,6-dihydroxybenzoová	4,767	1,52	0,18	0,73	0,86	0,72	0,64	1,214	1,00	0,00
Kyselina 4-aminobenzoová	4,915	1,60	0,20	1,08	1,65	0,94	0,60	1,032	0,94	0,00
Kyselina salicylová	4,946	1,62	0,21	0,89	0,84	0,71	0,38	0,990	1,00	0,00
Kyselina skořicová	5,742	2,04	0,31	1,14	1,00	0,58	0,57	1,171	0,98	0,00
Kyselina mandlová	4,241	1,24	0,09	0,90	1,05	0,74	0,89	1,131	0,99	0,00
Kyselina <i>o</i>-kumarová	6,118	2,24	0,35	1,13	1,39	1,07	0,79	1,229	0,99	0,00
Kyselina <i>p</i>-kumarová	5,076	1,69	0,23	1,13	1,39	1,07	0,79	1,229	0,99	0,00
Kyselina 4-hydroxyfenyloctová	4,433	1,35	0,13	0,94	1,32	0,97	0,78	1,131	0,99	0,00
Anilin	2,771	0,47	-0,33	0,96	0,96	0,26	0,41	0,816	0,00	0,04

Látka	t_R /min	k	$\log k$	E	S	A	B	V	$D^{-}_{6,0}$	$D^{+}_{6,0}$
<i>o</i>-Toluidin	2,846	0,51	-0,30	0,97	0,92	0,23	0,45	0,957	0,00	0,03
1,4-toluidine	2,886	0,53	-0,28	0,92	0,95	0,23	0,45	0,957	0,00	0,09
Chlorobenzen	2,864	0,52	-0,29	0,72	0,65	0,00	0,07	0,839	0,00	0,00
1,2,3-Trichlorobenzen	3,425	0,81	-0,09	1,03	0,86	0,00	0,00	1,084	0,00	0,00
4-Chlorofenol	2,727	0,44	-0,35	0,92	1,08	0,67	0,21	0,898	0,00	0,00
3-Hydroxybenzaldehyd	2,659	0,41	-0,39	0,99	1,38	0,74	0,40	0,932	0,00	0,00
Benzamid	2,774	0,47	-0,33	0,99	0,50	0,49	0,67	0,973	0,00	0,00
2-Naftol	3,477	0,84	-0,08	1,52	1,08	0,61	0,40	1,144	0,00	0,00
Hydrochinon	2,578	0,36	-0,44	1,00	1,00	1,16	0,60	0,834	0,00	0,00
Dibenzothiofen	6,453	2,41	0,38	1,96	1,31	0,00	0,18	1,379	0,00	0,00
Pyridin	3,415	0,81	-0,09	0,63	0,84	0,00	0,52	0,675	0,00	0,12
2-Aminopyridin	3,843	1,03	0,01	0,98	1,10	0,32	0,63	0,775	0,00	0,87
4-Aminopyridin	3,099	0,64	-0,19	0,90	1,21	0,23	0,71	0,775	0,00	1,00
Kyselina šťavelová	14,281	6,56	0,82	0,48	0,64	1,37	0,67	0,539	1,99	0,00
Kyselina citronová				0,61	1,50	1,63	1,33	1,240	2,76	0,00

5.7 Vícenásobná lineární regrese

Pro 42 modelových LSER analytů byla s využitím softwaru NCSS provedena lineární regrese pro logaritmus retenčních faktorů látek a jejich molekulové deskriptory. Pro konkrétní chromatografické podmínky, tedy mobilní fázi tvořenou 0,025 mol·dm⁻³ NaH₂PO₄, pH 6,0 a acetonitrilem v poměru 10:90 (v/v) a stacionární fázi Phenosphere™ SAX byly vypočítány regresní koeficienty Abrahamovy solvatační rovnice, které jsou shrnuty v Tab. 17.

Tab. 17 Regresní koeficienty Abrahamovy solvatační rovnice pro dané chromatografické podmínky (MF složená z NaH₂PO₄ a ACN)

	<i>e</i>	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>v</i>	<i>d</i> ⁻	<i>d</i> ⁺	<i>c</i>
Regresní koeficient	0,52	-0,01	-0,26	-0,52	-0,30	1,02	-0,46	-0,59
Standardní chyba koeficientu	0,12	0,12	0,09	0,09	0,18	0,02	0,09	0,14
Interval spolehlivosti	±0,25	±0,24	±0,18	±0,18	±0,36	±0,17	±0,18	±0,29
Hodnota <i>p</i>	0,00	0,95	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00

Regresní koeficienty, které jsou tučně vyznačeny, jsou statisticky významné, a tedy významně ovlivňují retenci analytů na použité aniontové výměnné stacionární fázi. Na prodloužení retence analytů za těchto konkrétních experimentálních podmínek má největší vliv molekulový deskriptor *D*⁻ a *E*. Regresní koeficienty těchto deskriptorů mají kladnou hodnotu, jedná se tedy o uplatnění iontových (elektrostatických) interakcí (deskriptor *D*⁻) a interakcí pomocí vazeb dipól-indukovaný dipól s využitím π - a *n*-elektronů (deskriptor *E*) mezi záporně nabitým analytem a kladně nabitou stacionární fází. Regresní koeficienty pro deskriptory *A*, *B* a *D*⁺ mají zápornou hodnotu, nemají vliv na záchyt analytů na použité SF, převažují vodíkové vazby a elektrostatické interakce mezi analytem a mobilní fází. Vliv deskriptorů *S* a *V* na retenční chování analytů v konkrétním separačním systému je neprůkazný, statisticky nevýznamný. Hodnoty pravděpodobnosti *p* pro deskriptory *S* a *V* na zvolené hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) jsou větší než 0,05. Koeficient determinace vícenásobné lineární regrese *R*² má hodnotu 0,8945 a regresní koeficient *R* má hodnotu 0,9458.

Abrahamova solvatační rovnice pro konkrétní experimentální podmínky má tedy tvar:

$$\log k = -0,59 + 0,52 \cdot E - 0,01 \cdot S - 0,26 \cdot A - 0,52 \cdot B - 0,30 \cdot V + 1,02 \cdot D^- - 0,46 \cdot D^+ \quad (12)$$

Stejným způsobem jako v případě mobilní fáze obsahující acetonitril jako organický modifikátor, bylo postupováno i při použití mobilní fáze s obsahem methanolu.

Pro 42 modelových LSER analytů byla opět s využitím softwaru NCSS provedena vícenásobná lineární regrese pro logaritmus retenčních faktorů látek a jejich molekulových deskriptorů. Regresní koeficienty Abrahamovy solvatační rovnice byly vypočítány pro konkrétní chromatografické podmínky, kterými byla mobilní fáze tvořena 0,025 mol·dm⁻³ NaH₂PO₄, pH 6,0 a methanolem v poměru 10:90 (v/v) a stacionární fáze PhenosphereTM SAX. Získané regresní koeficienty jsou shrnuty v Tab. 18.

Tab. 18 Regresní koeficienty Abrahamovy solvatační rovnice pro konkrétní chromatografické podmínky (MF složená z NaH₂PO₄ a methanolu)

	<i>e</i>	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>v</i>	<i>d</i> ⁻	<i>d</i> ⁺	<i>c</i>
Regresní koeficient	0,48	-0,07	-0,29	-0,29	-0,20	0,61	-0,15	-0,19
Standardní chyba koeficientu	0,11	0,11	0,08	0,08	0,16	0,07	0,08	0,13
Interval spolehlivosti	±0,23	±0,22	±0,26	±0,16	±0,32	±0,15	±0,16	±0,26
Hodnota <i>p</i>	0,00	0,53	0,00	0,00	0,21	0,00	0,05	0,14

Opět jsou tučně vyznačeny regresní koeficienty, jejichž hodnoty jsou statisticky významné. Na prodloužení retence analytů na použité aniontové výměnné stacionární fázi má největší vliv deskriptor *D*⁻ a *E*, jejichž regresní koeficienty *d*⁻ a *e* mají stejně jako v předchozím případě kladnou hodnotu. Opět se tedy uplatňují iontové (elektrostatické) interakce (deskriptor *D*⁻) a interakce pomocí vazeb dipól-indukovaný dipól s využitím π a *n*-elektronů (deskriptor *E*). Regresní koeficienty pro deskriptory *A* a *B* mají zápornou hodnotu, mají vliv na snížení retence analytů vlivem vodíkové vazby, která převažuje mezi analytem a mobilní fází. Vliv deskriptorů *S*, *V* a *D*⁺ na retenční chování analytů v konkrétním separačním systému je neprůkazný, statisticky nevýznamný. Hodnoty pravděpodobnosti *p* pro deskriptory *S*, *V* a *D*⁺ na zvolené hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) jsou 0,05 nebo větší. Koeficient determinace vícenásobné lineární regrese *R*² má hodnotu 0,7884 a regresní koeficient *R* má hodnotu 0,8879.

Abrahamova solvatační rovnice pro konkrétní experimentální podmínky má tedy tvar:

$$\log k = -0,19 + 0,48 \cdot E - 0,07 \cdot S - 0,29 \cdot A - 0,29 \cdot B - 0,20 \cdot V + 0,61 \cdot D^{-} - 0,15 \cdot D^{+} \quad (13)$$

6 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo nalézt vhodné experimentální podmínky pro separaci sady diuretik na aniontově výměnné stacionární fázi PhenosphereTM SAX a pomocí metody LSER určit interakce, uplatňující se při retenci diuretik pro konkrétní experimentální podmínky.

Na základě provedené optimalizace složení mobilní fáze byla pro analýzu diuretik ve směsi použita mobilní fáze složená z $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaH_2PO_4 o pH 6,0 a organického modifikátoru methanolu v objemovém poměru 90:10 (v/v). V této mobilní fázi bylo možné rozdělit chlorthalidon a trichlormethiazid až na základní linii během 4 minut. Pro posouzení vlivu organického modifikátoru na chování studovaných diuretik byla měření provedena i v druhé mobilní fázi, která byla také složena z $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaH_2PO_4 o pH 6,0, ale organickým modifikátorem byl acetonitril. Jako stacionární fáze byla použita aniontově výměnná kolona PhenosphereTM SAX. Tyto podmínky byly použity jak pro separaci diuretik ve směsi, tak i pro změření retence 42 modelových LSER analytů.

Retenční časy LSER analytů byly použity pro výpočet retenčních faktorů. Jejich zlogaritmované hodnoty spolu s molekulovými deskriptory tvořily vstupní data pro vícenásobnou lineární regresi, která byla provedena pomocí softwaru NCSS. Vícenásobnou lineární regresi byly získány regresní koeficienty pro jednotlivé molekulové deskriptory a bylo možné pro obě mobilní fáze zapsat rozšířenou Abrahamovu rovnici. Pro obě mobilní fáze mají na retenci analytů největší vliv deskriptory D^- a E , jejichž regresní koeficienty d^- a e mají kladnou hodnotu, tedy elektrostatické interakce a interakce pomocí vazeb dipól-indukovaný dipól se silněji uplatňují mezi záporně nabitým analytem a kladně nabitou stacionární fází než mezi analytem a použitou mobilní fází. Velikost regresního koeficientu e je prakticky totožná pro MF obsahující methanol i acetonitril (0,48, respektive 0,52). V případě regresního koeficientu d^- byla získána vyšší hodnota pro MF obsahující acetonitril (1,02) v porovnání s MF obsahující methanol (0,61), lze tedy v prostředí acetonitrilu usuzovat na silnější iontové interakce mezi záporně nabitým analytem a kladně nabitou stacionární fází.

Regresní koeficienty a a b pro deskriptory A a B mají pro obě mobilní fáze zápornou hodnotu. Tyto deskriptory mají vliv na snížení retence, silněji se uplatňují vodíkové vazby mezi analytem a použitou mobilní fází. Regresní koeficient b má pro MF obsahující fosforečnanový pufr acetonitril hodnotu -0,52, pro MF obsahující methanol -0,29. V prostředí acetonitrilu se výrazněji uplatňuje vodíková vazba, kde mobilní fáze je donorem vodíku a analyt jeho akceptorem. Regresní koeficient pro deskriptor D^+ má pro mobilní fázi tvořenou

fosforečnanovým pufrem a acetonitrilem zápornou hodnotu, má vliv na snížení retence uplatněním elektrostatické interakce mezi kladně nabitým analytem a mobilní fází. Vliv deskriptoru D^+ na retenční chování analytů je pro mobilní fázi tvořenou fosforečnanovým pufrem a methanolem statisticky nevýznamný.

7 Zdroje

- (1) Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*; Lucie Nováková ; Michal Douša: Praha [i.e. Hradec Králové]; [Klatovy, 2013].
- (2) *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference*; Springer: New York, 2014.
- (3) Bahadir, O. Ion-Exchange Chromatography and Its Applications. In *Column Chromatography*; Martin, D., Ed.; InTech, 2013. <https://doi.org/10.5772/55744>.
- (4) *HPLC in Nucleic Acid Research: Methods and Applications*; Brown, P. R., Ed.; Chromatographic science; M. Dekker: New York, 1984.
- (5) *Chromatography: Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods*, 6th ed.; Heftmann, E., Ed.; Journal of chromatography library; Elsevier: Amsterdam ; Boston, 2004.
- (6) Klouda, P. *Moderní analytické metody*; Pavel Klouda: Ostrava, 2003.
- (7) Cummins, P. M.; Dowling, O.; O'Connor, B. F. Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application to the Partial Purification of Soluble Mammalian Prolyl Oligopeptidase. In *Protein Chromatography*; Walls, D., Loughran, S. T., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; Vol. 681, pp 215–228. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_12.
- (8) *Protein Chromatography: Methods and Protocols*; Walls, D., Loughran, S. T., Eds.; Springer protocols; Humana Press: New York, N.Y, 2011.
- (9) *Liquid Column Chromatography: A Survey of Modern Techniques and Applications*; Deyl, Z., Macek, K., Janák, J., Eds.; Journal of chromatography library; Elsevier Scientific Pub. Co: Amsterdam ; New York, 1975.
- (10) Taraba, L.; Křížek, T.; Hodek, O.; Kalíková, K.; Coufal, P. Characterization of Polyaniline-Coated Stationary Phases by Using the Linear Solvation Energy Relationship in the Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Mode Using Capillary Liquid Chromatography: Taraba et Al. *J. Sep. Sci.* **2017**, *40* (3), 677–687. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600785>.
- (11) Sykora, D.; Vozka, J.; Tesarova, E. Chromatographic Methods Enabling the Characterization of Stationary Phases and Retention Prediction in High-Performance Liquid Chromatography and Supercritical Fluid Chromatography: Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2016**, *39* (1), 115–131. <https://doi.org/10.1002/jssc.201501023>.
- (12) Studzińska, S.; Buszewski, B. Linear Solvation Energy Relationships in the Determination of Specificity and Selectivity of Stationary Phases. *Chromatographia* **2012**, *75* (21–22), 1235–1246. <https://doi.org/10.1007/s10337-012-2310-9>.
- (13) Tesař, V.; Schück, O. *Klinická nefrologie*; Grada: Praha, 2006.
- (14) Jabor, A. *Vnitřní prostředí*; Grada: Praha, 2008.
- (15) Fontana, J.; Trnka, J.; Maďa, P.; Ivák, P.; Lavříková, P.; Nováková, L.; Pavelka, M.; Šajdíková, M. Tvorba Moči. In *Funkce buněk a lidského těla*.
- (16) Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie*; 2015.
- (17) Pudil, R. Farmakoterapie Chronického Srdečního Selhání. *Interní Med.* **2010**, *12* (3), 126–130.
- (18) Hartl, J. *Farmaceutická chemie III.*; Karolinum: Praha, 2000.
- (19) Špinar, J.; Vítovec, J. Diuretika v Kardiologii - Terapeutická Účinnost a Úskalí. *Remedia* **2008**, No. 2/2008.
- (20) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie 47 tabulek*; Grada Publ.: Praha, 2004.

- (21) Špác, J.; Souček, M.; Kianička, B. Diuretika u Hypertenze. *Medicína pro praxi* **2010**, 7 (3), 105–110.
- (22) *Percutaneous Penetration Enhancers*; Smith, E. W., Maibach, H. I., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 1995.
- (23) Málek, F.; Málek, I. *Srdeční Selhání*; Karolinum Press: Prague, 2018.
- (24) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.; Wirth, J.; Wenke, M. *Barevný atlas farmakologie*; Grada: Praha, 2012.
- (25) Szász, G.; Budvári-Bárány, Z. *Pharmaceutical Chemistry of Antihypertensive Agents*; CRC Press: Boca Raton, 1991.
- (26) Chlorthalidone, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2732>, 05.03.2019.
- (27) *Nurse's Handbook of Combination Drugs*, 2nd ed.; Jones and Bartlett Publishers: Sudbury, Mass, 2010.
- (28) *The Guide to Off-Label Prescription Drugs: New Uses for FDA-Approved Prescription Drugs*, 1st Free Press trade paperback ed.; Loughlin, K. R., Generali, J. A., Eds.; Free Press: New York, 2006.
- (29) Buthiazide, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/buthiazide>, 05.03.2019.
- (30) Trichlormethiazide, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trichlormethiazide>, 05.03.2019.
- (31) Bendroflumethiazide, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2315>, 05.03.2019.
- (32) Mefruside, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4047>, 05.03.2019.
- (33) Zendelovska, D.; Stafilov, T. Sample Preparation and RPHPLC Determination of Diuretics in Human Body Fluids. *Acta Pharm. Zagreb Croat.* **2006**, 56 (2), 115–142.
- (34) Guchelaar, H.-J.; Chandi, L.; Schouten, O.; van den Brand, W. A. A High Performance Liquid Chromatographic Method for the Screening of 17 Diuretics in Human Urine. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 363 (7), 700–705. <https://doi.org/10.1007/s002160051274>.
- (35) Sabo Müller, L.; Dal Molin, T. R.; Tomazi Muratt, D.; Camera Leal, G.; Gonzalez Urquhart, C.; Viana, C.; de Carvalho, L. M. Determination of Stimulants and Diuretics in Dietary Supplements for Weight Loss and Physical Fitness by Ion-Pair Chromatography and Pulsed Amperometric Detection (PAD). *Curr. Anal. Chem.* **2018**, 14 (6), 562–570. <https://doi.org/10.2174/1573411014666171229155726>.
- (36) Shaikh, B.; Rummel, N. Determination of Trichlormethiazide in Bovine Milk by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **1998**, 709 (1), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00035-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00035-8).
- (37) Goto, T.; Mikami, E.; Ohno, T.; Matsumoto, H. Simultaneous Analysis of Four Diuretic Drugs by HPLC and Its Application to Health Food Supplements Advertising Weight Reduction. *J. Food Hyg. Soc. Jpn. Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **2002**, 43 (2), 95–98. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.43.95>.
- (38) De Croo, F.; Van Den Bossche, W.; De Moerloose, P. Simultaneous Quantitative Determination of Butizide, Potassium Canrenoate and Canrenone in Tablets by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1986**, 354, 367–373. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)87037-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)87037-0).
- (39) Elshanawane, A. A.; Mostafa, S. M.; Elgawish, M. S. Development and Validation of a Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Amiloride Hydrochloride, Atenolol, Hydrochlorothiazide, and Chlorthalidone in Their Combined Mixtures. *J. AOAC Int.* **2009**, 92 (2), 404–409.
- (40) Guchelaar, H.-J.; Chandi, L. A High Performance Liquid Chromatographic Method for the Screening of 17 Diuretics in Human Urine.

- (41) Geryk, R.; Kalíková, K.; Vozka, J.; Tesařová, E. Immobilized Polysaccharide-Based Stationary Phases for Enantioseparation in Normal Versus Reversed Phase HPLC. *Chromatographia* **2015**, 78 (13–14), 909–915. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2804-8>.
- (42) Visegrády, B.; Konecsni, T.; Grobuschek, N.; Schmid, M. G.; Kilár, F.; Aboul-Enein, H. Y.; Gübitz, G. Chiral Separation of Thiazide Diuretics by HPLC on Chiralcel OD-RH®, Chiralcel OJ-R® and Chirobiotic-TTM® Phases. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, 53 (1–3), 15–24. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00088-X).